

Е. А. Кунавина (к.х.н., доц.)^{1а}, А. Н. Сизенцов (к.б.н., доц.)^{1б},
Т. В. Левенец (к.х.н., преп.)^{1а}, Е. В. Саликова (магистрант)^{1а},
Д. С. Королькова (студ.)^{1б}, В. О. Козьминых (д.х.н., проф.)²

СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 4-АРИЛЗАМЕЩЕННЫХ 1,4-ДИОКСО-1-ЭТОКСИ-2-АЛКЕНОЛЯТОВ НАТРИЯ

¹ Оренбургский государственный университет,

^а кафедра химии, ^б кафедра биохимии и микробиологии

460018, г. Оренбург, пр. Победы, д. 13; тел. (3532) 372485, e-mail: kea20072007@yandex.ru, asizen@mail.ru

² Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, кафедра химии

614990, г. Пермь, ул. Сибирская, д. 24; тел. (342) 2386378, e-mail: kvoncstu@yahoo.com

Е. А. Kunavina¹, А. N. Sizensov¹, Т. V. Levenets¹,
Е. V. Salikova¹, D. S. Korolkova¹, V. O. Kozminykh²

SYNTHESIS, STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SUBSTITUTED SODIUM 4-ARYL-1,4-DIOXO-1-ETHOXY-2-ALKENOLATES

¹ Orenburg State University

460018, Orenburg, 13, Pobedy Pr.; ph. (3532) 372485, e-mail: kea20072007@yandex.ru

² Perm State Humanitarian Pedagogical University

614990, Perm, Sibirskaya Str., 24, Bld. 4; ph. (342) 2386378, e-mail: kvoncstu@yahoo.com

Конденсацией Клайзена арилметилкетонов с диэтилоксалатом в среде неполярных растворителей синтезированы 4-арилзамещенные 1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-оляты натрия. Структура полученных соединений подтверждено методами ИК и ЯМР ¹H спектроскопии и масс-спектрометрии. Изучена антимикробная активность синтезированных соединений. Оценка ингибирующего влияния проведена с использованием метода агаровых лунок. Выявлено выраженное бактерицидное действие 4-(4'-нитрофенил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олята натрия в отношении *E. coli* и *Bacillus subtilis*.

Ключевые слова: антимикробная активность; арилметилкетоны; конденсация Клайзена; оксоеноляты натрия; спектральный анализ.

Синтез новых веществ с широким спектром биологической активности представляется актуальным^{1, 2}. Имеющиеся сведения³⁻⁵ о проявлении противомикробного действия соединений, полученных в результате оксалильной конденсации Клайзена, и продуктов их превращений позволяют продолжить исследования в этом направлении.

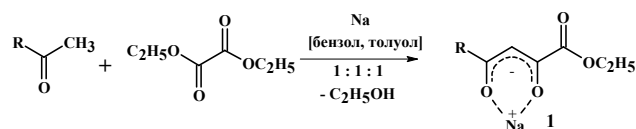
С целью получения потенциально биологически активных веществ, нами осуществлен синтез 4-арилзамещенных 1,4-диоксо-1-эток-

Дата поступления 29.05.18

4-Arylsubstituted of 1,4-dioxo-1-ethoxy-2-butene-2-olates of sodium are synthesized by Claisen condensation of arylmethylketones with diethyl oxalate in a nonpolar solvent. The structure of obtained compounds is confirmed by IR and NMR ¹H spectroscopy and mass-spectrometry. The antimicrobial activity of synthesized compounds is studied. Evaluation of the inhibitory effect is carried out using the method of agar wells. The expressed bactericidal effect of 4-(4'-nitrophenyl)-1,4-dioxo-1-ethoxy-2-butene-2-sodium-2-olate on *E. coli* and *Bacillus subtilis* is revealed.

Key words: antimicrobial activity; arylmethylketones; Claisen condensation; sodium oxoenoates; spectral analysis.

си-2-алкенолятов натрия конденсацией арилметилкетонов с диэтилоксалатом в присутствии натрия в качестве конденсирующего агента в среде бензола или толуола при соотношении исходных реагентов 1:1:1 (схема 1)⁶.



R= 4'-BrC₆H₄ (1a), 4'-NO₂C₆H₄ (1б)

Схема 1

В табл. 1 приведены физико-химические свойства синтезированных оксоенолятов натрия (**1a**, **1б**).

Таблица 1

**Характеристики
4-(4'-бромфенил)-1,4-диоксо-1-этокси-
2-бутен-2-олята натрия (1a)
и 4-(4'-нитрофенил)-1,4-диоксо-1-этокси-
2-бутен-2-олята натрия (1б)**

Соединение	R	Т. пл., °С	Выход, %	Брутто-формула (мол. масса)
1a	4'-BrC ₆ H ₄	215-222	85	C ₁₂ H ₁₀ BrNaO ₄ (321.10)
1б	4'-NO ₂ C ₆ H ₄	245-250 (разл.)	81	C ₁₂ H ₁₀ NNaO ₆ (287.20)

Полученные соединения **1a** и **1б** представляют собой желтые или желто-оранжевые кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде, диметилсульфоксиде, трудно растворимые в этаноле, бензоле, хлороформе.

Структура полученных соединений подтверждена с привлечением спектральных методов анализа.

Согласно данным спектрального анализа (ИК и ЯМР ¹H спектроскопии) доказано существование 4-арил-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олятов натрия в виде двух возможных (*Z*)- и (*E*)-изомерных форм.

Следующим этапом экспериментальной работы являлось изучение антимикробной активности синтезируемых соединений. В качестве биологических объектов нами использовались клинические изоляты бактериальных штаммов: *Bacillus subtilis* 534 – грамположительная, спорообразующая аэробная почвенная бактерия; *Escherichia coli* M17 – грамотрицательная палочка, ни спор, ни капсул не образует; *Staphylococcus aureus* P-209 – грамположительная кокковая форма микроорганизмов. Оценку ингибирующего действия проводили с использованием метода агаровых лунок (данный метод относится к диффузионным методам исследования).

В качестве тестового вещества с выраженной бактерицидной активностью нами использовался фурацилин.

Обобщая и интерпретируя полученные в ходе выполнения экспериментов данные, следует отметить, что наиболее выраженным бактерицидным действием в отношении *E. coli* и *Bacillus subtilis* обладает 4-(4'-нитрофенил)-

1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олят натрия (**1б**), имеющий практически идентичные зоны подавления роста в одномольярных концентрациях, сопоставимые с ингибирующим действием фурацилина в концентрации 0.063М. Однако следует отметить, что по мере снижения уровня концентрации исследуемого соединения регистрируется усиление его биологического действия в отношении данных микроорганизмов, что, на наш взгляд, может быть связано с увеличением проникающей способности 4-(4'-нитрофенил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олята натрия через защитные оболочки клеток с последующим воздействием на органеллы. При этом *S. aureus* проявляют видовую устойчивость к ингибирующему действию данного соединения.

Аналогичная картина биологического действия в отношении *E. coli* и *Bacillus subtilis* регистрируется у 4-(4'-бромфенил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олята натрия (**1a**). Однако, в данном случае выраженность биологического действия, скорее всего, связана с воздействием на поверхностные структуры клеток, так как по мере снижения уровня концентрации исследуемого соединения регистрируется ослабление ингибирующего действия на тест-организмы.

Экспериментальная часть

ИК спектры полученных соединений записаны на спектрофотометре «Инфралюм ФТ-02» в пасте твердого вещества в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ¹H соединений получены на приборе «MERCURYplus-300» (300.05 МГц) в растворе диметилсульфоксида, внутренний стандарт – ТМС. Масс-спектр соединения **1a** записан на квадрупольно-времяпролетном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения maXis impact HD, Bruker Daltonik GmbH (ЦКП «САОС», ИОС УрО РАН). Положительные ионы регистрировали в режиме электрораспылительной ионизации (ESI) в диапазоне масс 50–1300 Da. Образцы, растворенные в ДМСО, и разбавленные ацетонитрилом (соотношение ДМСО/MeCN = 1:90), вводили шприцевым насосом при скорости потока 240 мкл/ч.

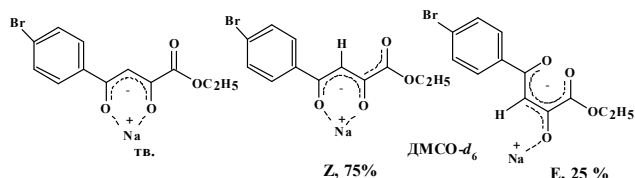
Индивидуальность полученных веществ подтверждали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе бензол-эфир-ацетон, 10:9:1 или ацетон-гексан 2:3, хроматограммы проявляли парами иода. Исходные реактивы перед использованием очищали перегонкой.

Синтез 4-арил-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олятов натрия 1.

Общая методика. К смеси 25 ммоль соответствующих арилметилкетонов (4-бромацето-

фенона и 4-нитроацетофенона), 3.65 г (25 ммоль) диэтилоксалата и 50–100 мл бензола или толуола добавляли при перемешивании небольшими порциями 0.58 г (25 ммоль) натрия. Смесь реагентов кипятили 1.5–2 ч (контроль ТСХ), осадок отфильтровывали, полученные оксоеноляты промывали эфиром. Получили целевые натриевые еноляты **1a** и **16**.

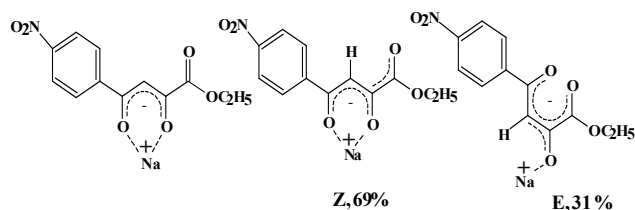
4-(4'-Бромфенил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олят натрия (**1a**)



Выход: 6.82 г, 85%. Т. пл. 215–222 °С. ИК спектр, ν , см^{-1} (тв.): 1735 ν ($\text{C}^{(1)}=\text{O}$, E-изомер), 1711 ν ($\text{C}^{(1)}=\text{O}$, Z-изомер), 1627 ν ($\text{C}^{(4)}=\text{O}$), ν ($\text{C}^{(2)}=\text{C}^{(3)}$), ν ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1588 ($\text{C}=\text{C}$, Ar, E-изомер), 1567 ν ($\text{C}=\text{C}$, Ar, Z-изомер), 1522 ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1475 $\delta_{\text{ас}}$ (CH_3), 1438 ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1381 $\delta_{\text{с}}$ (CH_3 , Z-изомер), 1368 $\delta_{\text{с}}$ (CH_3 , E-изомер), 1255 $\nu_{\text{ас}}$ ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$, Z-изомер), 1213 $\nu_{\text{ас}}$ ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$, E-изомер), 1178 $\delta_{\text{мят}}$ ($\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$), 1104 $\delta_{\text{плоские}}$ (CH , Ar, E-изомер), 1074 $\delta_{\text{плоские}}$ (CH , Ar, Z-изомер), 1023 $\nu_{\text{с}}$ ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$, E-изомер), 1009 $\nu_{\text{с}}$ ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$, Z-изомер), 948, 875, 841 $\nu_{\text{скелетные}}$ ($\text{C}-\text{C}$), 759 $\delta_{\text{неплос}}$ ($\text{C}-\text{H}$, Ar), 680, 663, 646, 627, 552 ($\text{C}-\text{Br}$, E-изомер), 513 ν ($\text{C}-\text{Br}$, Z-изомер). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (ДМСО- d_6): 1.25 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.2 Гц, E-изомер, 25%), 1.27 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.1 Гц, Z-изомер, 75%), 4.12 кв (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.2 Гц, E-изомер), 4.15 кв (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.3 Гц, Z-изомер), 5.31 с (1H, C^3H , E-изомер), 6.30 с (1H, C^3H , Z-изомер), 7.54 д (2H, C^3H , C^5H в C_6H_4 , E-изомер), 7.62 д (2H, C^3H , C^5H в

C_6H_4 , Z-изомер) 7.69 д (2H, C^2H , C^6H в C_6H_4 , E-изомер), 7.76 д (2H, C^2H , C^6H в C_6H_4 , Z-изомер). Найдено: m/z 320.9734 [M^+], 321.9767 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. Вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNaO}_4^+$: 321.0992.

4-(4'-Нитрофенил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олят натрия (**16**)



Выход: 5.85 г, 81%. Т. пл. 245–250 (разл.) °С. ИК спектр, ν , см^{-1} (тв.): 1735 ν ($\text{C}^{(1)}=\text{O}$, E-изомер), 1715 ν ($\text{C}^{(1)}=\text{O}$, Z-изомер), 1634 ν ($\text{C}^{(4)}=\text{O}$), ν ($\text{C}^{(2)}=\text{C}^{(3)}$), 1596 ν ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1524 ν ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1508 ν ($\text{C}=\text{C}$, Ar), 1419, 1395, 1349, 1318. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (ДМСО- d_6): 1.21 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.2 Гц, E-изомер, 31%), 1.29 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 6.9 Гц, Z-изомер, 69%), 4.01 кв (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.2 Гц, E-изомер), 4.15 кв (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7.3 Гц, Z-изомер), 5.39 с (1H, C^3H , E-изомер), 6.35 с (1H, C^3H , Z-изомер), 7.97 д (2H, C^2H , C^6H в C_6H_4 , E-изомер), 8.03 д (2H, C^2H , C^6H в C_6H_4 , Z-изомер), 8.21 д (2H, C^3H , C^5H в C_6H_4 , E-изомер), 8.29 д (2H, C^3H , C^5H в C_6H_4 , Z-изомер).

Методика определения антимикробной активности. Мясо-пептонный агар в чашке Петри засеивали тест-организмом сплошным «газоном». При помощи пробочного сверла (диаметром 8 мм) вырезали агаровые лунки в количестве 7 штук на одной чашке Петри, в которые вносили исследуемые концентрации веществ для оценки их ингибирующего действия. Чашки помещали в термостат на 24 ч

Таблица 2

Изучение биологической активности исследуемых соединений

Исследуемые соединения	<i>E. coli</i> M17				
	1 Моль	0.5 Моль	0.25 Моль	0.125 Моль	0.063 Моль
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNaO}_4$	13.00±4.36	8.10±4.67*	5.67±2.96**	–	–
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NNaO}_6$	14.67±0.33***	15.33±1.20*	17.00±1.53	13.33±1.76	13.33±1.75
Фурацилин	21.00±0.58	21.67±1.20	20.33±1.21	17.00±1.53	14.67±0.88
	<i>B. subtilis</i> 534				
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNaO}_4$	13.30±2.19*	9.80±2.67**	6.90±2.33**	5.30±0.67***	–
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NNaO}_6$	14.33±1.33**	15.67±2.19*	16.00±1.53	15.67±2.19	11.67±0.33***
Фурацилин	25.33±2.33	25.00±2.52	21.33±1.86	21.33±1.33	21.00±1.00
	<i>S. aureus</i> P-209				
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNaO}_4$	18.70±3.38	13.70±1.86**	5.70±2.84**	–	–
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NNaO}_6$	18.67±1.67*	18.67±0.67*	17.33±1.20*	18.33±0.88	14.00±1.00
Фурацилин	30.00±3.00	27.33±2.33	25.67±1.76	22.33±1.86	18.67±1.76

Примечание: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 (расчет *t* критерия Стьюдента по отношению к фурацилину)

при температуре 37 °С, с последующим учетом роста и визуальной оценки влияния исследуемого соединения на рост и морфологию тест организма. Степень чувствительности микроба к исследуемому веществу определяли по шири-

не задержки роста, выражаемой в миллиметрах или по концентрации вещества в том последнем разведении, которое еще в состоянии задерживать рост микробов (табл. 2).

Литература

1. Григорьева О.Б., Голованов А.А., Бекин В.В., Земцова М.Н. Использование системного подхода при исследовании веществ с потенциальной биологической активностью // Баш. хим. ж.— 2012.— Т.19, №5.— С.37-42.
2. Григорьева С.С., Чичуа В.Т., Деветьяров Д.А., Кумсков М.И. Выбор оптимального описания структуры молекулы в задаче структура-активность для заданной биологической активности // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия.— 2007.— Т.48, №5.— С.305-307.
3. Перевалов С.Г., Бургарт Я.В., Салоутин В.И., Чупахин О.Н. (Гет)ароилпириновинградные кислоты и их производные как перспективные «строительные блоки» для органического синтеза // Успехи химии.— 2001.— Т.70, №11.— С. 1039-1058.
4. Козьминых В.О., Козьминых Е.Н. Синтез, строение и биологическая активность ацилпириновинградных кислот и их 2-иминопроизводных: Обзор // Хим.-фарм. журнал.— 2004.— Т.38, №2.— С.10-20.
5. Левенец Т.В., Сизенцов А.Н., Козьминых В.О. Синтез, строение и противомикробная активность 3-арилгидразоно-2,4-диоксогексановых кислот // Приволжский химико-технологический вестник.— 2016.— №1(1).— С.31-36.
6. Кунавина Е.А., Козьминых В.О. Синтез, строение три- и тетракарбонильных соединений, реакции с нуклеофильными реагентами и комплексообразование с солями металлов // Естественные и математические науки в современном мире: Матер. XXIV междунар. науч.-практ. конф.— Новосибирск: Изд. «СибАК», 2014.— №11(23).— С.167-178.

References

1. Grigor'eva O.B., Golovanov A.A., Bekin V.V., Zemtsova M.N. *Ispol'zovaniye sistemnogo podkhoda pri issledovanii veshchestv s potentsial'noy biologicheskoy aktivnost'yu* [Investigation of the compounds with potential biological activity by systems approach]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2012, vol.19, no.5, pp.37-42.
2. Grigor'eva S.S., Chichua V.T., Devet'yarov D.A., Kumskov M.I. *Vybor optimal'nogo opisaniya struktury molekuly v zadache struktura-aktivnost dlya zadannoi biologicheskoi aktivnosti* [Selection of optimal description of molecules pattern for given bioactivity in structure-property problem]. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya* [Bulletin of Moscow University. Series 2: Chemistry], 2007, vol.48, no.5, pp.305-307.
3. Perevalov S.G., Burgart Ya.V., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. [(Het)aroylpyruvic acids and their derivatives as promising building blocks for organic synthesis]. *Russian Chemical Reviews*, 2001, vol.70, no.11, pp.921-938. doi: 10.1070/RC2001v070n11ABEH000685.
4. Kozminykh V.O., Kozminykh E.N. [Synthesis, structure, and biological activity of acylpyruvic acids and related 2-imino derivatives (a review)] *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2004, vol.38, no.2, pp.67-77. doi: 10.1023/B:PHAC.0000032482.69814.90.
5. Levenets T.V., Sizensov A.N., Kozminykh V.O. *Sintez, stroenie i protivomikrobnaya aktivnost 3-arilgidrazono-2,4-dioksogeksanovykh kislot* [Synthesis, structure and antimicrobial activity of 3-arylhydrazono-2,4-dioxohexanoic acids]. *Privolzhskii khimiko-tehnologicheskii vestnik* [Privolzhsky chemical-technological bulletin], 2016, no.1(1), pp.31-36.
6. Kunavina E.A., Kozminykh V.O. *Sintez, stroeniye tri- i tetrakarbonil'nykh soyedineniy, reaktsii s nukleofil'nyimi reagentami i kompleksoobrazovaniye s solyami metallov* [Synthesis, structure of three- and tetracarbonyl compounds, reactions with nucleophilic reagents and complexation with metal salts]. *Estestvennye i matematicheskie nauki v sovremennom mire. Mater. XXIV mezhdunar. nauch.-prakt. konf. no.11(23)*. [XXIV International scientific and practical conference «Natural and mathematical sciences in the contemporary world»]. *Novosibirsk, Sibak Publ.*, 2014, no.11(23), pp.167-178.