

В. Р. Ахметова (д.х.н., проф.)¹, Р. А. Зайнуллин (д.х.н., проф.)²,
Н. С. Ахмадиев (к.х.н., н.с.)¹, Н. А. Глушкова (магистрант)², Р. В. Кунакова (д.х.н., проф.)²

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ КОМПЛЕКС ПАЛЛАДИЯ(II) С БИС(1,2-ИЗОКСАЗОЛ-4-ИЛМЕТИЛСУЛФАНИЛ)ЭТАНОМ: СИНТЕЗ И РОСТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

¹ Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН,
лаборатория гетероатомных соединений

450075, г. Уфа, пр. Октября, 141, e-mail: vnirara@mail.ru

² Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра специальной химической технологии
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1, e-mail: 5599032@mail.ru

V. R. Akhmetova¹, R. A. Zainullin², N. S. Akhmadiev¹, N. A. Glushkova², R. V. Kunakova²

WATER-SOLUBLE PALLADIUM (II) COMPLEX WITH BIS(1,2-ISOXAZOL-4-ILMETILSULFANIL) ETHANE: SYNTHESIS AND GROWTH-STIMULATING ACTIVITY AGAINST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

¹ Institute of Petrochemistry and Catalysis of the UFRC of RAS,
141, Prospekt Otyabrya Str., 450075, Ufa, Russia, e-mail: vnirara@mail.ru

² Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov Str., 450062, Ufa, Russia, e-mail: 5599032@mail.ru

Последовательным взаимодействием ацетилацетона с CH_2O и 1,2-этандитиолом (реакция тиометилирования), далее, *in situ*, с гидроксиламином (реакция Кнорра) и последующим взаимодействием синтезированного лиганда с ацетатом палладия синтезирован водорастворимый комплекс Pd(II) с бис(1,2-изоксазол-4-илметилсульфанил)этаном. Выявлена ростостимулирующая активность водорастворимого органо-палладиевого комплекса на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – сахаромидцы, продуцирующие этанол.

Ключевые слова: ацетилацетон; водорастворимый комплекс палладия(II); дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*; реакция тиометилирования; ростостимулирующая активность.

Работа выполнена в рамках проектной части государственного задания АААА-А19-119022290010-9 и при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-43-020292p_a.

A palladium(II) water-soluble complex was synthesized with a bis(1,2-isoxazol-4-ylmethylsulfanyl)ethane ligand by successive transformations of acetylacetone with CH_2O and 1,2-ethanediol (thiomethylation reaction) and then *in situ* with hydroxylamine (Knorr reaction) followed by the interaction of the synthesized ligand with palladium acetate. The growth-promoting activity of the water-soluble organo-palladium complex on *Saccharomyces cerevisiae* yeast, accharomycetes producing ethanol, has been established.

Key words: acetylacetone; growth stimulating activity; thiomethylation reaction; water-soluble palladium(II) complex; yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The work was performed as part of the project part of the state task АААА-А19-119022290010-9 and with financial support from the RFBR grant 17-43-020292r_a.

Перспективными подходами в создании возобновляемых источников энергии, в частности, биотоплива, являются процессы сбраживания полисахаридов растительного происхождения, а именно, сельскохозяйственных и промышленных отходов, с участием сахаромикетов. При этом увеличение выхода биотоплива может быть обеспечено за счет улучшения качества микроорганизмов с помощью синтетических стимуляторов их роста. Недавно мы сообщали¹ о ростостимулирующей активности в отношении дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* бис-изоксазолов, связанных метилсульфанильными цепочками,.

В данной работе в качестве стимулятора роста *Saccharomyces cerevisiae*, продуцирующих этанол, изучен водорастворимый комплекс диацетата палладия с бис(1,2-изоксазол-4илметилсульфанил)этаном (**1**). Ранее нами было установлено², что дихлоропалладиевый комплекс с данным лигандом является практически не токсичным соединением и проявляет гепатопротекторные свойства.

Материалы и методы исследования

Для синтеза целевого продукта использовали коммерчески доступные исходные соединения с чистотой >98% (Acros organics и Sigma Aldrich). Контроль ростостимулирующей активности осуществляли путем подсчета количества дрожжевых клеток с использованием камеры Горяева и светового микроскопа.

Синтез 4,4'-[этан-1,2-диилбис-сульфанилметил)ен]бис-(диметилизоксазола) (**1**) осуществляли по методике³.

Реакцию ацетата палладия с лигандом **1** проводили в ацетонитриле при 60 °С по методике, описанной в⁴. Получили желтый порошок, т.пл. 146–148 °С. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ¹H ДМСО-D₆), δ, м. д. (J, Гц): 1.77 (6H, с, Me), 2.22 (6H, с, Me), 2.43 (6H, с, Me), 2.69 (2H, дд, ²J = 9.5, SCH₂CH₂S), 2.69 (2H, дд, ²J = 9.5, SCH₂CH₂S), 2.92 (2H, дд, ²J = 14.5, CH₂S), 3.35 (2H, дд, ²J = 9.5, SCH₂CH₂S), 4.15 (2H, дд, ²J = 14.0, IzCH₂S), 4.25 (2H, дд, ²J = 14.0, IzCH₂S), 4.37 (2H, дд, ²J = 14.5, IzCH₂S), 4.46 (2H, дд, ²J = 14.0, IzCH₂S). Спектр ЯМР ¹³C (500 МГц, ДМСО-D₆) 10.1, 11.3, 23.2, 28.9, 29.4, 34.9, 35.2, 107.8, 159.7, 168.9, 175.4,

Методика приготовления ячменного сусла.

В стакан помещали 100 г раздробленного на лабораторной мельнице солода и 400 мл

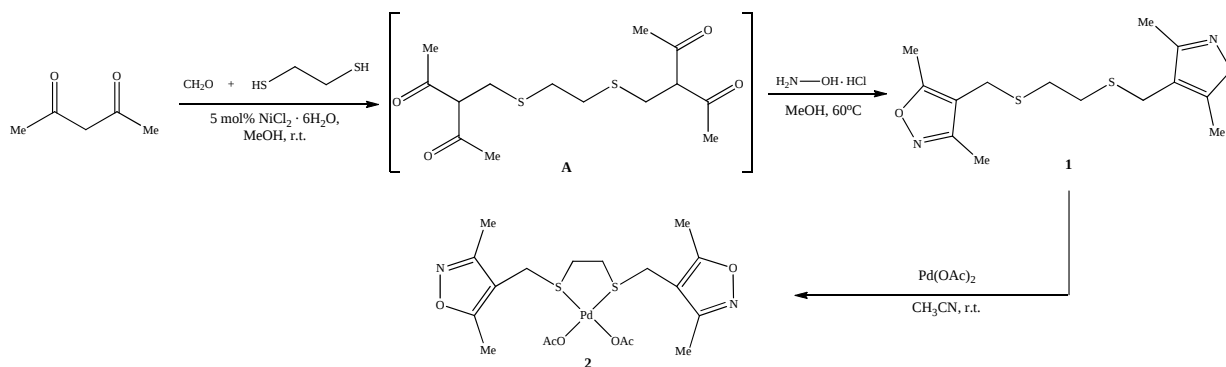
воды с температурой 42 °С. Стакан помещали в термостат, нагретый до 42 °С, и выдерживали 30 мин, периодически перемешивая содержимое. Затем температуру затора повышали до 52 °С, выдерживая белковую паузу 30 мин. Далее температуру заторной массы поднимали до 63 °С, выдерживая мальтозную паузу еще 30 мин. После выдержки затор подогревали до 70 °С, проводя осахаривание в течение 30 мин. Затем температуру поднимали до 72 °С и выдерживали до полного осахаривания. Конец осахаривания проверяли по иодной пробе. Окончанием осахаривания считают момент, когда цвет раствора и иода остаются неизменными. Осахаренный затор фильтровали через бумажный фильтр.

Методика тестирования ростостимулирующей активности синтезированного соединения **2** на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

В работе использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы 717 для получения этилового спирта, полученный из коллекции ВНИИПБТ (Москва). Для культивирования *Saccharomyces cerevisiae* в качестве питательной среды использовали ячменное сусло. Дрожжевую разводку готовили, исходя из расчета 0.05 г дрожжей на 100 мл питательной среды, разливали в конические колбы в одинаковом объеме для культивирования. Путем последовательных разведений готовили растворы тестируемого соединения в этаноле и вносили их в среду, содержащую *Saccharomyces cerevisiae*. Тестируемое соединение **2** оценивали в дозировках 0.0373, 0.07462 и 0.1343 ммоль/л.

Контроль — ячменное солодовое сусло без добавления химических соединений. Дрожжи инкубировали в термостате при 25 °С до стационарной фазы роста. Через сутки подсчитывали количество живых и погибших клеток с использованием камеры Горяева и светового микроскопа Микмед-5 (ЛОМО, Россия) с комплексом визуализации ТСА-3.0 С. Также оценивали морфологические характеристики дрожжей - внешний вид клеток, состояние клеточной стенки и просматриваемых в цитоплазме органелл. Для анализа оценивали не менее 3000 клеток. Статистическую значимость между вариантами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0.95. Повторность экспериментов трехкратная.

Содержание спирта в дистиллятах определяли по показателям преломления спирта на лабораторном рефрактометре ИРФ-454 Б2М.



Результаты и их обсуждение

Стратегия синтеза целевого продукта **2** основывается на последовательных реакциях синтеза лиганда **1** и его комплексообразования с диацетатом палладия(II) (схема).

Первоначально в режиме one-pot осуществляли тиометилирование ацетилацетона реагентом «CH₂O-этандитиол» с последующей гетероциклизацией интермедиата **A** по реакции Кнорра с гидроксиламином с образованием бис-изоксазола **1**³.

Реакция ацетата палладия с лигандом **1** в соотношении 1:1 дает растворимый в воде продукт **2**, что открывает возможность его использования в биохимических процессах. С учетом этого, проведены опыты по изучению влияния соединения **2** на рост и активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* через

определение выхода этанола при спиртовом брожении растительных полисахаридов.

Для изучения процесса сбраживания дрожжи вносили в ячменное сусло из расчета 0.05 г/100 мл. После часовой выдержки при температуре 25 °С добавляли соединение **2** и проводили культивирование дрожжей, наблюдая за процессом в течение 5–7 дней. Следует отметить, что токсического действия соединения **2** на дрожжи не было выявлено.

Влияние соединения **2** на рост клеток дрожжей представлено на рис. 1. Как видно, прирост числа дрожжевых клеток наиболее эффективно стимулируется в концентрации соединения **2**, равной 0.1343 ммоль/л, причем

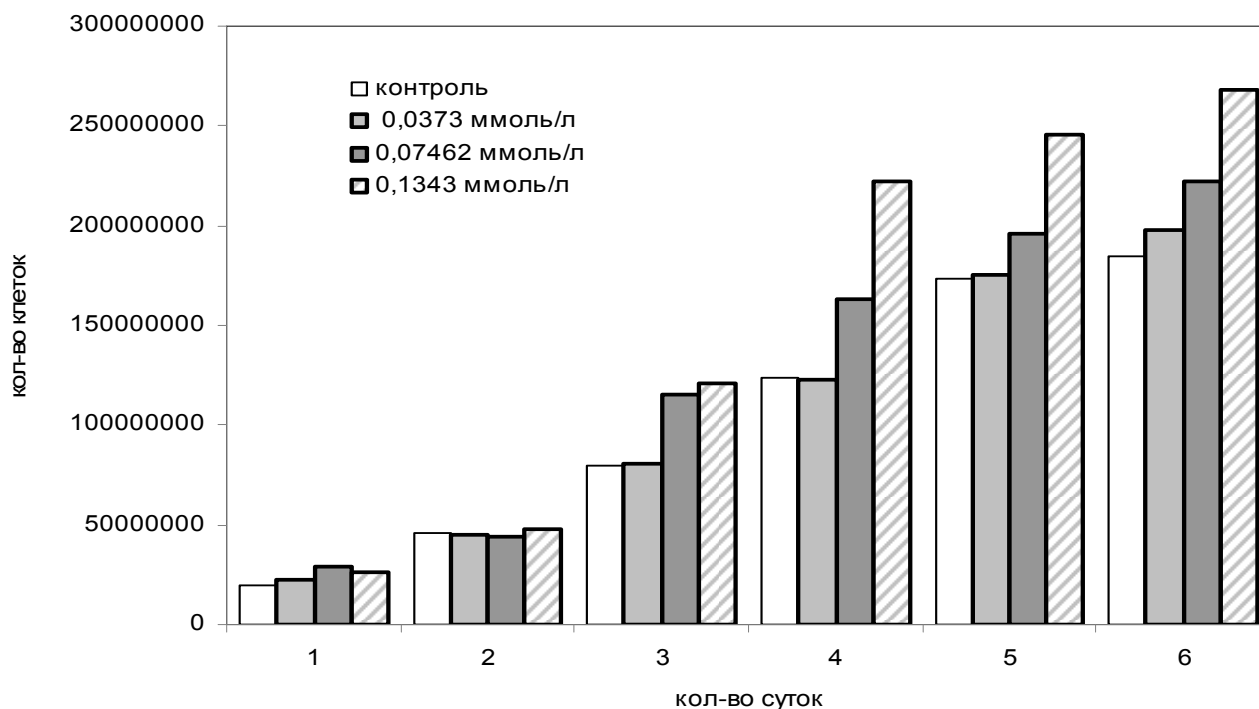


Рис. 1. График зависимости общего количества дрожжей от времени культивирования при добавлении соединения **2** в концентрациях 0.0373, 0.07462 и 0.1343 ммоль/л.

стимулирующий эффект начинает проявляться на третьи сутки от начала культивирования.

Для определения массовой доли спирта в исследуемых образцах осуществляли прямую перегонку. В дистиллятах методом рефрактометрии определяли количество этилового спирта (табл. 1).

Таблица 1

Массовая доля этилового спирта в полученных дистиллятах

Концентрация 2, моль/л	Количество этанола в 20 мл дистиллята, г
Контроль	1.596
0.0373	1.76
0.07462	1.847
0.1343	1.9528

С увеличением концентрации соединения 2 увеличивается выход спирта, причем при концентрации 2, равной 0.1343 ммоль/л, наблюдается максимальное увеличение выхода C_2H_5OH на 17%.

Таким образом, полученные результаты показали, что диацетат 1,2-ди(3,5-диметил-изоксазол-4-илметилсульфанил)этан палладия (II) 2 оказывает ростостимулирующую активность на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, способствуя увеличению выхода этанола при сбраживании полисахаридов.

Литература

1. Ахметова В.Р., Зайнуллин Р.А., Ахмадиев Н.С., Хуснутдинова Э.К., Ялаев Б.И., Кунакова Р.В. Мультикомпонентный синтез водорастворимых гидрохлоридов сульфаниламидных азолов и их ростостимулирующая активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* // Баш. хим. ж.— 2016.— Т.23, №3.— С. 28-34.
2. Akhmetova V.R., Galimova R.A., Akhmadiev N.S., Galimova A.M., Khisamutdinov R. A., Nurtidinova G. M., Agletdinov E. F., Kataev V. A. Synthesis of bis(isoxazol-4-ylmethylsulfanyl)alkanes and some metal complexes as a hepatoprotective agents // Adv. Pharm. Bull.— 2018.— V.8, №2.— Pp.267-275.
3. Akhmetova V.R., Akhmadiev N.S., Meshcheryakova E.S., Khalilov L.M., Ibragimov A.G. Multicomponent synthesis and biological activity of (sulfanylalkyl)-substituted azaheterocycles // Chemistry of Heterocyclic Compounds.— 2014.— V.50, №5.— Pp.742-751.
4. Akhmadiev N.S., Meshcheryakova E.S., Khisamutdinov R.A., Lobov A.N., Abdullin M.F., Ibragimov A.G., Kunakova R.V., Akhmetova V.R. Synthesis, structure and catalytic activity of novel five-membered Pd(II) and Pt(II) metallaheterocycles based on 1,2-bis(3,5-dimethylisoxazol-4-yl-methylsulfanyl)ethane // J. Organomet. Chem.— 2018.— V.872.— Pp.54-62.

References

1. Akhmetova V.R., Zainullin R.A., Ahmadiev N.S., Khusnutdinova E.K., Yalaev B.I., Kunakova R.V. *Mul'tikomponentnyy sintez vodorastvorimykh gidrokhloridov sul'fanilzameshchennykh azolov i ikh rostostimuliruyushchaya aktivnost' v otnoshenii Saccharomyces cerevisiae* [Multicomponent synthesis of water-soluble hydrochlorides of sulfanyl-substituted azoles and their growth-promoting activity in relation to *Saccharomyces cerevisiae*]. Bashkirskii Khimicheskii Zhurnal [Bashkir Chemical Journal], 2016, vol.23, no.3, pp.28-34.
2. Akhmetova V. R., Galimova R.A., Akhmadiev N.S., Galimova A.M., Khisamutdinov R.A., Nurtidinova G.M., Agletdinov E.F., Kataev V.A. [Synthesis of bis(isoxazol-4-ylmethylsulfanyl)-alkanes and some metal complexes as a hepatoprotective agents]. *Adv. Pharm. Bull.*, 2018, vol.8, no.2.— Pp.267-275.
3. Akhmetova V.R., Akhmadiev N.S., Meshcheryakova E.S., Khalilov L.M., Ibragimov A.G. [Multicomponent synthesis and biological activity of (sulfanylalkyl)-substituted azaheterocycles]. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2014, vol.50, no.5, pp.742-751.
4. Akhmadiev N.S., Meshcheryakova E.S., Khisamutdinov R.A., Lobov A.N., Abdullin M.F., Ibragimov A.G., Kunakova R.V., Akhmetova V.R. [Synthesis, structure and catalytic activity of the novel five-membered Pd(II) and Pt(II) metallaheterocycles based on 1,2-bis(3,5-dimethylisoxazol-4-yl-methylsulfanyl)ethane]. *J. Organomet. Chem.*, 2018, vol.872, pp.54-62.