

Р.Б. Винницька, Р.Т. Конечна, А.С. Крвавич, Н.Є. Стадницька, Л.Р. Журахівська, Н.Г. Маринцова,  
С.В. Половкович, В.П. Новіков

## Синтез аналогів природних шиконінів та їх антимікробна активність

Національний університет «Львівська політехніка»

**Ключові слова:** аналоги шиконінів, ацилювання, антимікробна активність.

Взаємодією 2-хлоро- і 2,3-дихлоронафтазарину з 3,3-диметил-2-пропеніламіном синтезували азотомісні аналоги природного шиконіну, ацилювання яких ацетил- або бензоіл ангідридом призводить до відповідних N-ацильованих шиконінів. Біологічний скринінг отриманих продуктів показав, що вони характеризуються антимікробною активністю.

### Синтез аналогов шиконинов природного происхождения и их противомикробная активность

Р.Б. Винницкая, Р.Т. Конечная, А.С. Крвавич, Н.Е. Стадницкая, Л.Р. Жураховская, Н.Г. Маринцова, С.В. Половкович, В.П. Новиков

Взаимодействием 2-хлоро- и 2,3-дихлоронафтазарина с 3,3-диметил-2-пропениламином синтезировали азотсодержащие аналоги шиконина природного происхождения, при ацилировании которых получили соответственно N-ацилированные шиконины. Биологический скрининг полученных веществ показал, что они проявляют антимикробную активность.

**Ключевые слова:** аналоги шиконина, ацилирование, антимикробная активность.

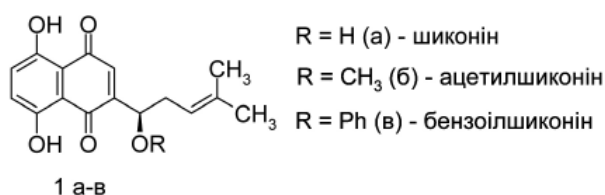
### Synthesis of analogues of natural shikonin and their antimicrobial activity

R.B. Vynnytska, R.T. Konechna, A.S. Kravaych, N.E. Stadnytska, L.R. Zhurahivska, N.G. Marintsova, S.V. Polovkovych, V.P. Novikov

Nitrogencontaining analogs of natural shikonin were obtained by interaction of 2-chloro- and 2,3-dichloronaphthazarine with 3,3-dimethyl-2-propenylamine. N-Acylating shikonines were prepared by acylation of it. The biological screening of obtained substances appeared compounds with antimicrobial activity.

**Key words:** shikonin analogs, acylation, antimicrobial activity.

Хіноїдні сполуки широко розповсюджені у природі [1] та відіграють важливу роль у життєдіяльності клітини [2]. Багато з них характеризуються різноманітною біологічною активністю, а деякі відомі як лікарські препарати [3]. Оскільки нині досить швидкого темпу набрав розвиток досліджень у галузі синтезу та вивчення біологічної активності продуктів взаємодії хіноїдних сполук з амінами та амінокислотами [4,5], розроблено підхід до спрямованого синтезу аміновмісних аналогів (4а,б, 5а,б) природних шиконінів (1а-в).



### Мета роботи

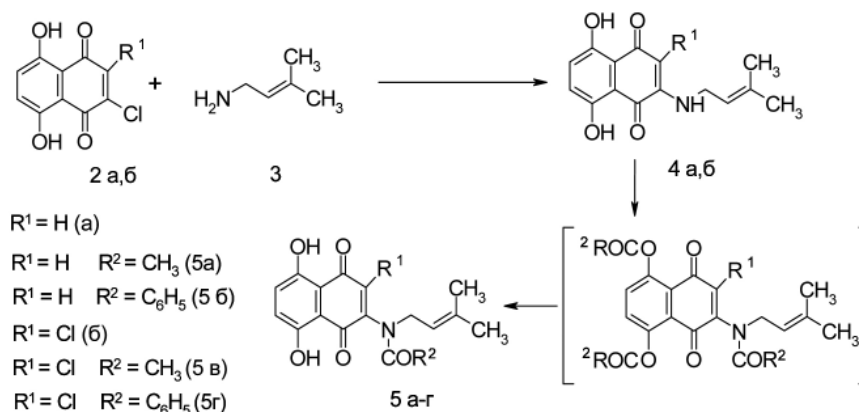
Отримання нових, невідомих раніше N-вмісних синтетичних аналогів (4 а,б, 5а-г) природного антибіотика шиконіну (1а) (схема 1) та визначення їх антимікробної активності.

### Матеріали і методи дослідження

Для синтезу N-вмісних аналогів (4 а,б, 5 а-г) використано 2-хлоро- і 2,3-дихлоро-5,8-дигідрокси-1,4-нафтохіноні (2 а,б) і 3,3-диметилаліламін фірми Aldrich.

Спектри <sup>1</sup>H ЯМР записано на спектрофотометрі «Varian XL-400» у CDCl<sub>3</sub>, внутрішній стандарт – ГМДС. ІЧ-спектри записано на спектрофотометрі «Specord IR-75» у таблетках з КВг. Контроль за перебігом реакції та індивідуальністю речовин виконано методом ТШХ на пластинках «Silufol UV-254». При визначенні температури плавлення сполук поправку на виступаючий стовпчик ртуті не проводили.

Схема 1



5,8-Дигідрокси-2-(3,3-диметил-2-пропеніламіно)-1,4-нафтохінон (4а). До розчину 1,00 г (0,0045 моль) 5,8-дигідрокси-2-хлоро-1,4-нафтохінону (2 а) в 100 мл етанолу додали при кімнатній температурі протягом 0,5 год 0,85 г (1,00 мл, 0,010 моль) 3,3-диметил-2-пропеніламіну (3) в 10 мл етилового спирту. Реакційну масу витримували при кип'янні протягом 6 год, 2/3 об'єму розчинника відігнали у вакуумі, а оранжеві кристали, що утворились, відфільтрували, промили холодним етанолом (2×50 мл), висушили у вакуумі.

Вихід – 0,9 г (73%),  $T_{\text{пл.}} = 116\text{--}118^\circ\text{C}$ . Знайдено, %: С 65,42; Н 5,21; N 5,25.  $C_{15}H_{15}NO_4$ ; Вирахувано, %: С 65,93; Н 5,53; N 5,13; ІЧ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3450, 3384, 1658, 1640, 1598, 1585, 1530, 1320;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , м.ч.): 1,67с і 1,78с (6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,54м (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,83д.д (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 5,21с (NH), 7,15с (1H<sup>2</sup>), 7,26с (2H<sup>6,7</sup>), 12,36 і 12,48с (2H, OH).

5,8-Дигідрокси-2-(3,3-диметил-2-пропеніламіно)-3-хлоро-1,4-нафтохінон (4 б) синтезували за уже описаною методикою (4 а) з 1,0 г (0,0039 моль) 2,3-дихлоронафтазарину (2 б) і 0,85 г (1,00 мл, 0,010 моль) 3,3-диметил-2-пропеніламіну (3).

Вихід – 1,04 г (87%),  $T_{\text{пл.}} = 126\text{--}127^\circ\text{C}$ . Знайдено, %: С 58,65; Н 4,21; Cl 11,41; N 4,25.  $C_{15}H_{14}ClNO_4$ ; Вирахувано %: С 58,55; Н 4,59; Cl 11,52; N 4,55; ІЧ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3480, 3407, 1634, 1638, 1605, 1586, 1525, 1318, 765;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , м.ч.): 1,65 і 1,72с (6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,48м (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,62м (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 5,63с (NH), 6,92с (1H<sup>2</sup>), 7,32с (2H<sup>6,7</sup>), 12,42 і 12,46с (2H, OH).

*Ацетилування хінонів (4 а,б). Загальна методика.*

До суспензії 0,005 моль 5,8-дигідрокси-2-(3,3-диметил-2-пропеніламіно-3- $R^1$ -1,4-нафтохінону (4 а,б) в 10 мл оцтового ангідриду при кімнатній температурі додали 5–6 крапель концентрованої сірчаної кислоти і витримали протягом 24 год. Реакційну суміш обробили 100 мл 5% водним розчином гідроксиду натрію і витримали протягом 10 хв, підкислили 10% соляною кислотою до рН = 6–7. Жовті кристали, що випали, фільтрували, промили холодною дистильованою водою (3×150 мл) і холодним спиртом (2×100 мл), сушили у вакуумі.

*N*-(5,8-Дигідрокси-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-іл)-*N*-(3-метилбут-2-ен-1-іл)ацетамід (5 а). Вихід – 1,05 г (98%) світло-жовтих кристалів з  $T_{\text{пл.}} = 135\text{--}136,5^\circ\text{C}$ . Знайдено, %: С 64,83; Н 5,25; N 4,32.  $C_{17}H_{17}NO_5$ ; Вирахувано, %: С 64,75; Н 5,43; N 4,44. ІЧ спектр,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3440, 1736, 1680, 1642, 1605, 1590, 1520, 1326. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , м.ч.): 1,59с і 1,68с (6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,13с (3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2,62м (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,90т (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 7,08с (1H<sup>2</sup>), 7,25с (2H<sup>6,7</sup>), 12,32 і 12,42с (2H, OH).

*N*-(5,8-Дигідрокси-3-хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-іл)-*N*-(3-метилбут-2-ен-1-іл)ацетамід (5 в). Вихід – 1,16 г (97%) яскраво-жовтих голчатих кристалів з  $T_{\text{пл.}} = 141\text{--}143^\circ\text{C}$ ; Знайдено, %: С 58,65; Н 4,31; Cl 10,41; N 4,25.  $C_{17}H_{16}ClNO_5$ ; Вирахувано %: С 58,38; Н 4,61; Cl 10,14; N 4,00; ІЧ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3450, 1728, 1678, 1640, 1600, 1586, 1510, 1320, 782;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , м.ч.): 1,63 і 1,72с (6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,18с (3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2,52м

(2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,58т (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 6,96с (2H<sup>6,7</sup>), 12,36 і 12,48с (2H, OH).

*Бензоїлювання хінонів (4 а,б). Загальна методика.*

До суспензії 0,005 моль 5,8-дигідрокси-2-(3,3-диметил-2-пропеніламіно)-3- $R^1$ -1,4-нафтохінону (4 а,б) у 20 мл діоксану при інтенсивному перемішуванні додали 2,26 г (0,1 моль) бензоїл ангідриду і 5–6 крапель концентрованої сірчаної кислоти, витримали при 20°C протягом 24 год. Реакційну суміш обробили 100 мл 5% водним розчином гідроксиду натрію і витримали протягом 10 хв, підкислили 10% соляною кислотою до рН = 6–5. Світло-жовті кристали промили дистильованою водою (3×150 мл) і холодним спиртом (2×100 мл), сушили у вакуумі.

*N*-(5,8-Дигідрокси -1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-іл)-*N*-(3-метилбут-2-ен-1-іл)бензоїламід (5б). Вихід – 1,82 г (96%) світло-жовтих кристалів з  $T_{\text{пл.}} = 211\text{--}213^\circ\text{C}$ . Знайдено, %: С 70,21; Н 5,12; N 3,91.  $C_{22}H_{19}NO_5$ ; Вирахувано, %: С 70,02; Н 5,07; N 3,71; ІЧ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3450, 1728, 1674, 1638, 1610, 1590, 1530;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , м.ч.): 1,60с і 1,68с (6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,61м (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,76т (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 6,83-7,19м (8H, аром.)

*N*-(5,8-Дигідрокси-3-хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-іл)-*N*-(3-метилбут-2-ен-1-іл)бензоїламід (5г). Вихід – 1,96 г (95%) світло-жовтих кристалів з  $T_{\text{пл.}} = 226\text{--}228^\circ\text{C}$ . Знайдено, %: С 64,58; Н 4,92; Cl 9,00; N 3,87.  $C_{22}H_{18}ClNO_5$ ; Вирахувано, %: С 64,16; Н 4,41; Cl 8,61; N 3,40; ІЧ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3450, 1732, 1680, 1642, 1605, 1590, 1510, 1326, 765;  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\delta$ , м.ч.): 1,66с і 1,74с (6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,50м (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,64м (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 6,80-7,22м (7H, аром.)

Скринінг на антимікробну активність виконано за стандартною методикою на 8 тест-об'єктах (5 видів грибів (*Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium sativum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*) і 3 штами бактерій (*Xanthomonas malvacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*)) [7–9]. Як еталон використовували 2,3-дихлоронафтазарин і ТМТД (тетраметилтіурамдисульфід). Похибка результатів активності коливалась у межах  $\pm 2\%$ .

Фунгіцидну активність досліджуваних сполук визначали методом оцінки відсотка пригнічення росту колоній міцелію грибів *in vitro*. Для цього в чашки Петрі розливали картопляно-декстрозне агаризоване поживне середовище, в яке попередньо внесли ацетоновий розчин досліджуваної речовини з розрахунку отримання в середовищі концентрації 0,003%. Через 24 год після випаровування ацетону проводили посів спор тест-культур грибів (навантаження  $10^5$  спор/мл). Засіяні чашки ставили на інкубацію в термостат за температури 22–25°C. Підрахунок проводили через 72 год шляхом визначення відсотка росту колоній грибів порівняно з контролем.

#### Результати та їх обговорення

Як аналог терпеноїдного ланцюга застосовували його аміноаналог – диметилаліламін (3), що в реакції нуклеофільного заміщення атома хлору в нафтазаринах (2 а,б)

призводить до бажаних продуктів – аміновмісних аналогів природного шиконіну (4 а) і його хлоропохідного (4 б). Обробка останніх ацетил- або бензоїл ангідридами призводить до утворення аміноаналогів (5 а-г) природних шиконінів (1 б,в).

Підтвердженням будови сполук (4 а,б) є наявність в їх ІЧ спектрах характерної смуги поглинання валентних коливань зв'язку N-H при 3384 і 3407  $\text{cm}^{-1}$ , відповідно; відсутність смуги поглинання C-Cl в області 700–800  $\text{cm}^{-1}$  для нафтазарину (4а) і наявність смуги C-Cl при 765  $\text{cm}^{-1}$  для нафтазарину (4б) з відповідними інтенсивними характерними смугами валентних коливань хіноїдних карбонільних груп в інтервалі від 1658 до 1634  $\text{cm}^{-1}$  та двох гідроксильних угруповань в області 3600–3450  $\text{cm}^{-1}$ . У спектрі  $^1\text{H}$  ЯМР спостерігають всі відповідні сигнали протонів, що відповідають запропонованій структурі (4а,б), а наявність диметильованого фрагмента підтверджується двома синглетами при 1,67 і 1,78 м.ч. шести протонів двох метильних груп, при 2,54 м.ч. – мультиплетом двох метиленових протонів і дублетом дублетів метинових протонів при 4,83 м.ч. Інтегральні інтенсивності в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР повністю відповідають і корелюють зробленим віднесенням протонів.

Ацилювання аміношиконінів (4 а,б) оцтовим або бензойним ангідридом за наявності каталітичної кількості сірчаної кислоти призводить до отримання ацильованих продуктів (5 а-г), будова яких однозначно підтверджується наявністю в ІЧ спектрах інтенсивної смуги валентних коливань карбонільних груп ацильного фрагмента в області 1718–1736  $\text{cm}^{-1}$ , відсутністю смуги поглинання

зв'язку N-H в області 3360–3420  $\text{cm}^{-1}$  та появою додаткових сигналів протонів метильного для (5 а,в) і фенольного для (5 б,г) фрагментів у спектрі  $^1\text{H}$  ЯМР.

Шиконін (1а) та його численні природні аналоги, в тому числі ацильовані (1 б, в), характеризуються багатьма видами біологічної активності [6]. Безумовний інтерес викликає оцінка біологічної активності нових синтезованих азотовмісних аналогів шиконіну (4 а,б, 5 а-г). Результати досліджень фунгіцидної та бактерицидної активності наведено в таблиці 1. Показано, що деякі синтезовані хінони (4б, 5 б,в) за фунгіцидною активністю знаходяться на рівні еталону порівняння 2,3-дихлоронафтазарину, а сполука (5 в) навіть перевищує показники обох еталонів – 2,3-дихлоронафтазарину та ТМТД.

З метою встановлення кількісних даних чутливості тестових культур бактерій до дії синтезованих речовин використовували метод серійних розведень [9]. Як середовище використовували м'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Мікробне навантаження становило  $5 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл середовища. Тривалість інкубації бактерій — 24 год при 37°C. Результати встановлення показників мінімальної бактерицидної концентрації синтезованих сполук наведено в таблиці 2. Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити припущення, що в ряду досліджених сполук існує певна залежність між будовою молекули і її антимікробною активністю, що, в свою чергу, дозволяє визначити подальші напрямки спрямованого синтезу сполук з більшою біологічною активністю. Загалом, N-вмісні аналоги шиконіну (4 б, 5б,в) проявляють вищу фунгібактерицидну активність, ніж вихідні нафтазарини (2 а,б).

Таблиця 1

**Фунгіцидна активність синтезованих сполук**

№ сполук	Пригнічення росту міцелію грибів, % до контролю				
	F. oxysporum	H. sativum	P. expansum	B. cinerea	A. niger
2 а	54	60	68	62	55
4 а	63	68	74	68	71
4 б	69	74	76	86	68
5 а	58	60	75	65	74
5 б	80	85	79	82	100
5 в	100	100	90	74	100
5 г	49	68	68	48	56
Дихлоронафтазарин	60	60	75	80	65
ТМТД	90	90	100	95	100

Таблиця 2

**Бактерицидна активність синтезованих сполук**

№ сполук	Мінімальна бактерицидна концентрація, мкг/мл		
	Xanthomonas malvacearum	Escherichia coli	Staphylococcus aureus
2 б	500	1000	1000
4 а	500	1000	1000
4 б	250	250	1000
5 а	250	500	1000
5 б	250	250	250
5 в	250	500	500
5 г	500	500	1000

### Висновки

Взаємодією 2-хлоро- і 2,3-дихлоро-5,8-дигідрокси-1,4-нафтохінонів (2 а,б) з 3,3-диметиламіном отримано нові синтетичні аналоги (4 а,б), ацилювання яких призводить до отримання їх похідних (5 а-г).

Біологічний скринінг показав, що N-вмісні гідроксинафтахінони (4 а,б, 5 а-г) проявляють досить високу антимікробну активність і є перспективними для подальших досліджень.

### Список літератури

1. Thomson R.H. Naturally Occurring Quinones / Thomson R.H. – Chapman & Hall: London, 1987. – 732 p.
2. Биохимия человека / [Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэл В.]. – М.: Мир, 1993. – Т. 1. – 381 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. / Машковский М.Д. – М.: Химия, 1988. – 576 с.
4. Bittner S. When quinines meet amino acids: chemical, physical and biological consequences / Bittner S. // Amino Acids. – 2006. – Vol. 30, Iss. 3. – P. 205–224.
5. Курка М.С. Синтез та властивості хіноїдних сполук. I. Галогенування та реакції хіноїдних сполук з N-нуклеофільними реагентами / М.С. Курка, О.Б. Миколів, О.П. Бондарчук, М.В. Стасевич, Р.Я. Мусянович, Н.Г. Марінцова, В.П. Новіков // Журнал орг. та фарм. хімії. – 2010. – Т. 8, вип. 4 (32). – С. 40–50.
6. Романова А.С. Хиноны высших растений как возможные лечебные средства / А.С. Романова, А.В., Патудин, А.И. Баньковский // Химико-фармацевтический журн. – 1977. – №7. – С. 53–65.
7. Методические рекомендации по определению фунгицидной активности новых соединений. – Черкассы: ВНИИХСЗР, НИИТЭХИМ, 1994. – С. 4–26.
8. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1960. – №4. – С. 76–85.
9. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии / Першин Г.Н. – М.: Медицина, 1971. – 540 с.

### Відомості про авторів:

Винницька Р.Б., здобувач каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Конечна Р.Т., асистент каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Кривавич А.С., аспірант каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Стадницька Н.Є., доцент каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Журахівська Л.Р., доцент каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Марінцова Н.Г., доцент каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Половкович С.В., асистент каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Новіков В.П., професор, зав. каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Надійшла в редакцію 07.02.2013 р.