

Электроокислительное тиоцианирование азопиразолов*

А.С. Кудинова, Е.Д. Силинг, Н.В. Горпинченко,
В.Л. Сигачева, Б.В. Лялин, В.А. Кокорекин

Впервые показана возможность электроокислительной C—H-функционализации азопиразолов на примере их моно- и дитиоцианирования в мягких условиях с выходом 47–52%. Исследованы основные закономерности процесса и выявлена противогрибковая активность полученных продуктов, сопоставимая с противогрибковым препаратом флуконазол или превосходящая его.

Ключевые слова: азосоединения, тиоцианирование, электросинтез, вольтамперометрия, противогрибковая активность.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №19-29-08027).

Введение

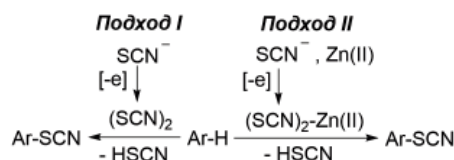
Азо(гет)арены представляют несомненный научный и практический интерес как фармакологически активные вещества [1], красители [2] и высокоэнергетические материалы [3]. Среди основных подходов к их синтезу, наряду с традиционным азосочетанием, очевидные перспективы имеет окислительное N—N-сочетание амина(гет)аренов [4]. В последние годы нами была разработана альтернативная версия данного подхода с участием электро(ре)генерированных реагентов ($\text{NiO}(\text{OH})$, NaOCl , NaOBr), что позволило получить широкий ряд азопиразолов [5–6]. В то же время был реализован комплекс работ по электросинтезу тиоцианатопроизводных пиразола, часть из которых показала выраженную противогрибковую активность [6]. В развитие этих направлений в настоящей работе были получены новые соединения, содержащие азо- и тиоцианатогруппу и проведены их предварительные биологические испытания.

Обсуждение результатов

В прежних исследованиях [6] были предложены подходы к тиоцианированию (гет)аренов с участием электрогенерированного псевдогалогена диородана, $(\text{SCN})_2$, в отсутствие и в присутствии хлорида цинка как коммер-

чески доступного электрофильного катализатора (схема 1, подходы I и II соответственно). Кроме того, была отмечена взаимосвязь потенциалов окисления (E_p^{ox}) исходных реагентов и их реакционной способности в отношении друг друга, что является ценной и относительно доступной информацией на этапе планирования синтетического эксперимента.

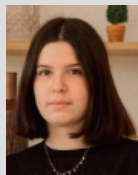
Схема 1



Соответственно, на начальном этапе настоящего исследования методом циклической вольтамперометрии (Pt – рабочий электрод, скорость развертки потенциала 0.1 В/с, фон 0.1 М перхлорат натрия в ацетонитриле) были измерены E_p^{ox} (отн. нас. к. э.) исходных реагентов (схема 2): (E)-1,2-бис(1,3-ди-



КУДИНОВА
Анастасия Сергеевна
ИОХ им. Н.Д. Зелинского
РАН



СИЛИНГ
Екатерина Дмитриевна
ИОХ им. Н.Д. Зелинского
РАН



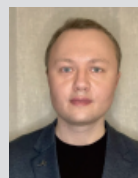
ГОРПИНЧЕНКО
Наталья Васильевна
Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский
университет)



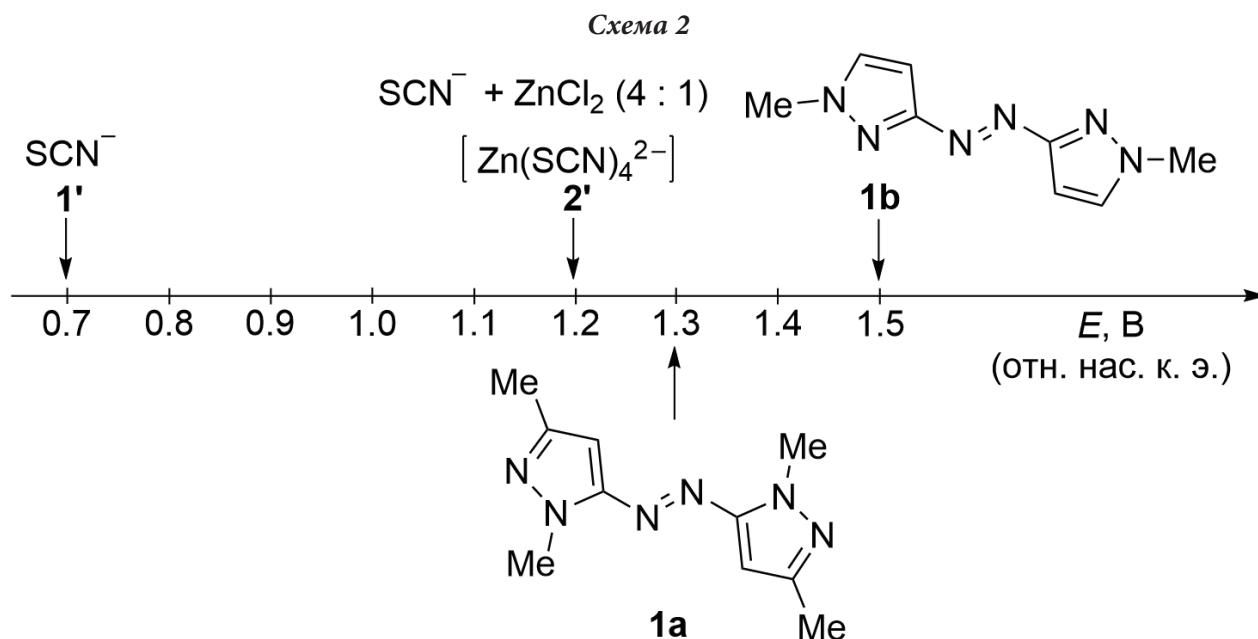
СИГАЧЕВА
Вера Леонидовна
ИОХ им. Н.Д. Зелинского
РАН



ЛЯЛИН
Борис Васильевич
ИОХ им. Н.Д. Зелинского
РАН



КОКОРЕКИН
Владимир Алексеевич
ИОХ им. Н.Д. Зелинского
РАН

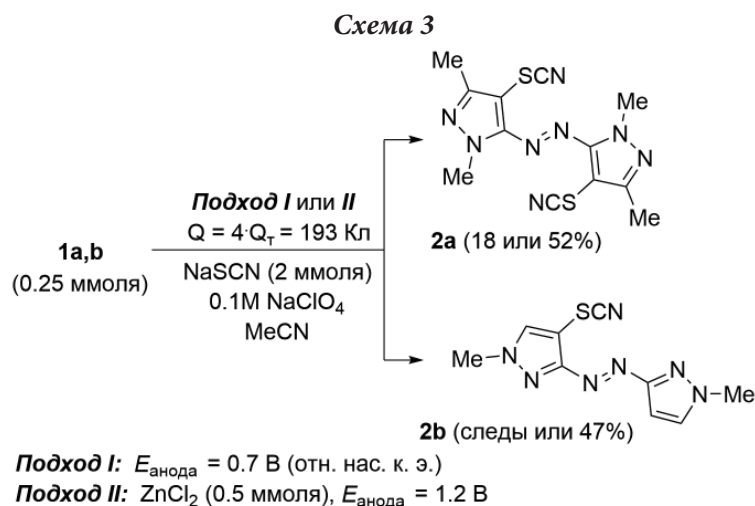


метил-1*H*-пиразол-5-ил)дiazена (**1a**), (*E*)-1,2-бис(1-метил-1*H*-пиразол-3-ил)дiazена (**2a**), тиоцианат-иона (**1'**) и тиоцианат-иона в присутствии хлорида цинка (**2'**).

Найдено, что азопиразол **1a** ($E_p^{\text{ox}}=1.3$ В) окисляется легче азопиразола **1b** ($E_p^{\text{ox}}=1.5$ В), поэтому первый должен обладать большей реакционной способностью в исследуемом процессе. Интересно, что добавление электрохимически неактивного ZnCl_2 ($E_p^{\text{ox}} > 2.7$ В) к тиоцианат-иону **1'** ($E_p^{\text{ox}}=0.7$ В), очевидно, приводит к возникновению комплексного иона $\text{Zn}(\text{SCN})_4^{2-}$ [7] ($E_p^{\text{ox}}=1.2$ В). От последнего ожидалась большая эффективность в реакции тиоцианирования из-за того, что он окисляется существенно ближе к исходным азопиразолам ($\Delta E=0.1-0.3$ В), нежели тиоцианат-ион ($\Delta E=0.6-0.8$ В).

В соответствии с данными циклической вольтамперометрии (схема 3) был реализован ряд электролизов на фоне 0.1 М раствора перхлората натрия в среде ацетонитрила в разделенной ячейке при комнатной температуре.

Так, электролиз при потенциале 0.7 В (подход I) при пропускании 4-кратного избытка электричества ($Q=193$ Кл, $Q_m=43.25$ Кл из расчета электрогенерации 0.25 ммоль $(\text{SCN})_2$) привел к дитиоцианату **2a** с выходом

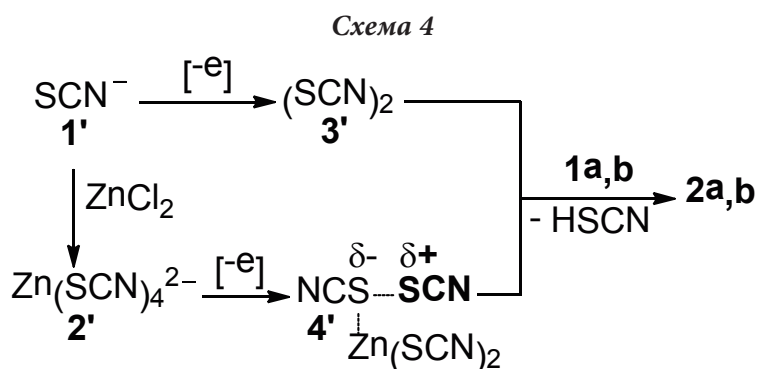


18% (при конверсии исходного азопиразола **1a** 34%). Азопиразол **1b** в реакцию практически не вступал, при этом наблюдалось интенсивное образование красно-желтого осадка полиродана – продукта полимеризации $(\text{SCN})_2$ [8]. Напротив, электролиз при потенциале 1.2 В в присутствии ZnCl_2 (подход II) привел к дитиоцианату **2a** с выходом 52% и моно thiоцианату **2b** с выходом 47% при полной конверсии исходных азопиразолов. Полученные результаты подтверждают предположение (см. выше), что реакционная способность более легкоокисляемого ($E_p^{\text{ox}}=1.3$ В) азопиразола **2a** (содержащего азогруппу в положении 5) выше, чем у более трудноокисляемого ($E_p^{\text{ox}}=1.5$ В) азопиразола **2b** (содержащего азогруппу в положении 3).

Важно отметить, что умеренный выход целевых продуктов **2a,b** и полная конверсия исходных **1a,b** могут быть результатом частичного анодного окисления последних, что подтверждается осмолением реакционной смеси в ходе электролиза. Кроме того, при использовании неразделенной ячейки выход продуктов **2a** и **2b** снизился до 10–15%, вероятно, из-за их катодного восстановления. В спектрах

ЯМР ^{13}C полученных соединений можно отметить характерные сигналы SCN-группы в интервале $\sim 110\text{--}121$ миллионных долей (м.д.).

Предполагаемый механизм [6] (схема 4) включает электроокисление тиоцианат-иона **1'** или его комплекса с цинком типа **2'** соответственно до диородана **3'** или его комплекса с цинком типа **4'**. Последующее их взаимодействие с азопиразолами **a,b** по пути электрофильного ароматического замещения в конечном итоге приводит к целевым тиоцианатам **2a,b**.



На завершающем этапе исследований исходные и полученные соединения (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**) и стандартные препараты сравнения (флуконазол, хлорамфеникол) были испытаны на активность в отношении грибковых (*C. albicans*, *A. niger*) и бактериальных тест-культур (*S. aureus*, *E. coli*) в соответствии с отечественной [9] и зарубежной [10–12] нормативной документацией. Критерием активности служила минимальная подавляющая концентрация (МПК), при которой отсутствовал видимый рост гриба или бактерии. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оценка противогрибковой и антибактериальной активности исходных и полученных соединений в сравнении со стандартными лекарственными препаратами

Соединение	Минимальная подавляющая концентрация (МПК, мкг·мл ⁻¹)			
	Грибы		Бактерии	
	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1a	>500	>500	>500	>500
2a	8.0	32.0	125	125
1b	>500	>500	>500	>500
2b	8.0	8.0	64	250
Флуконазол	8.0	125.0	>500	>500
Хлорамфеникол	>500	>500	4.0	1.0

Отметим, что исходные азопиразолы **1a,b** были неактивны в отношении всех представленных тест-культур (МПК > 500 мкг·мл⁻¹), тогда как их тиоцианатопродукты **2a,b** обладали выраженной (МПК 8.0–32.0 мкг·мл⁻¹, что сопоставимо с флуконазолом или превосходит его) и достаточно селективной противогрибковой активностью, так

как антибактериальная активность была низкая (МПК 64–250 мкг·мл⁻¹, что существенно ниже хлорамфеникола).

В результате проведенных исследований сделан первый шаг в направлении электроокислительной функционализации C—H-связей азопиразолов и показана возможность синтеза их ранее не описанных моно- и дитиоцианато-производных с выходом 47–52%. Мягкие условия, доступные реагенты и растворители, а также выявленная выраженная противогрибковая активность полученных соединений делает данное направление привлекательным для будущего развития.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали в растворе CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ на приборах Bruker Avance 300 (300.1 МГц для ^1H и 75.5 МГц для ^{13}C). Химические сдвиги приведены в м.д. по шкале δ относительно тетраметилсилана. Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, петролейный эфир, этилацетат, тиоцианат натрия, перхлорат натрия, хлорид цинка, безводный сульфат натрия являются коммерчески доступными реагентами и использовались без дополнительной очистки. (E)-1,2-Бис(1,3-диметил-1H-пиразол-5-ил)диазен (**1a**) и (E)-1,2-бис(1-метил-1H-пиразол-3-ил)диазен (**2a**) были получены с использованием методов, описанных в литературе [5].

Вольтамперометрические исследования проводили в термостатируемой (25 °C) ячейке ($V=10$ мл), используя потенциостат Р30JM фирмы Elins (скорость развертки – 0.1 В/с). Рабочий электрод – платиновая (Pt) проволока диаметром 1 мм в оболочке из тефлона, электрод сравнения – насыщенный каломельный электрод (нас. к. э.), отделенный от исследуемого раствора

солевым мостиком с раствором фонового электролита (0.1 М раствор NaClO_4 в MeCN), противоэлектрод – Pt-пластина ($S=3 \text{ см}^2$). Концентрация всех исследуемых соединений составляла 0.001 М.

Электрохимические синтезы проводили, используя тот же потенциостат и электрод сравнения, в токе аргона в стеклянной термостатируемой ячейке (60 мл) с 5-слойной диафрагмой из кальки. Электроды – Pt-анод ($S=16 \text{ см}^2$) и Pt-катод ($S=10 \text{ см}^2$).

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках фирмы Merck (детектор – ультрафиолетовый свет, 254 нм). Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля 0.035–0.070 мм, 60 Å фирмы «Acros Organics»

Общая методика электрохимического синтеза (подходы I и II)

В анодное пространство разделенной ячейки помещали 42 мл 0.1 М раствора NaClO_4 в MeCN, содержащего NaSCN (0.162 г, 2 ммоль), ZnCl_2 (в случае подхода II – 0.068 г, 0.5 ммоль) и азопиразол **1a,b** (0.048–0.055 г, 0.25 ммоль), в катодное пространство – 8 мл 0.1 М раствора NaClO_4 в MeCN. Электролиз проводили при интенсивном перемешивании при потенциале 0.7 В (подход I) или 1.2 В (подход II), пропуская 193 Кл электричества. Мониторинг конверсии субстратов проводили с помощью ТСХ. После окончания реакции растворитель отгоняли под вакуумом, добавляли воду (15 мл) и экстрагировали EtOAc (4×15 мл). Экстракты объединяли, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очистка колоночной хроматографией на SiO_2 (элюент – смесь петролейного эфира и EtOAc с увеличением объемной доли последнего от 5% до 100%) приводила к чистым тиоцианатам **2a,b** и (или) непрореагировавшим субстратам **1a,b**.

Физико-химические характеристики целевых продуктов

(E)-Диазин-1,2-диил-бис(1,3-диметил-1H-пиразол-5,4-диил)бис(тиоцианат) (**2a**)

Желтый порошок, температура плавления более 200 °С (разлагается). ^1H ЯМР (300.1 МГц, DMSO-*d*6) δ , м.д., J/Гц: 2.39 (с, 6H, Me), 4.20 (с, 6H, Me). ^{13}C ЯМР (75.5 МГц, DMSO-*d*6) δ , м.д.: 11.9 (2Me), 37.1 (2Me), 88.1 (2CS), 110.7 (2SCN), 150.2 (2C), 151.0 (2C—N=N). Масс-спектр высокого разрешения (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$. Рассчитано для $[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_8\text{S}_2]^+$: 333.0 699. Найдено 333.0697.

1-Метил-3-[(E)-(1-метил-1H-пиразол-3-ил)дiazенил]-1H-пиразол-4-ил тиоцианат (**2b**)

Желтый порошок, температура плавления 90–94 °С. ^1H ЯМР (300.1 МГц, DMSO-*d*6) δ , м.д., J/Гц: 3.99 (с, 3H, Me), 4.03 (с, 3H, Me), 6.57 (д, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=2.2 \text{ Гц}$, CH), 7.87 (д, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=2.2 \text{ Гц}$, CH), 8.13 (с, 1H, CH). ^{13}C ЯМР (75.5 МГц, DMSO-*d*6) δ , м.д.: 39.4 (Me, сливается с сигналом ДМСО), 39.9 (Me, сливается с сигналом ДМСО), 94.9 (CH), 111.79 (CS), 120.5 (SCN), 132.4 (CH), 133.6 (CH), 157.7 (C—N=N), 170.7 (C—N=N). Масс-спектр высокого разрешения (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Рассчитано для $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_7\text{SNa}]^+$: 270.0532. Найдено 270.0 532.

Микробиологические исследования исходных веществ **1a,b** и полученных продуктов **2a,b** проводили методом двукратных серийных разведений в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [9], рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute [10, 11] и European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [12]. В качестве тест-штаммов использовались *Candida albicans* ATCC 24433, *Aspergillus niger* ГНЦА 37a, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Escherichia coli* ATCC 25922. В ходе испытаний точную навеску каждого соединения (2 мг) растворяли в 0.2 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и получали раствор с концентрацией 10 000 мкг/мл. Далее готовили серию разведений в среде RPMI 1640 с 2% глюкозой (для грибных культур) или питательной среде Мюллера – Хинтона (для бактериальных культур) с диапазоном рабочих концентраций 0.0 015–500 мкг/мл. Для анализа противогрибковой активности в лунки планшетов вносили 100 мкл образца в питательной среде, титр инокулята (*C. albicans*, *A. niger*) был $2.5 \cdot 10^3 \text{ КОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$. Планшеты инкубировали в течение 48–72 ч при температуре 35 ± 2 °С. Для анализа антибактериальной активности (*S. aureus*, *E. coli*) объем рабочего раствора составлял 50 мкл, титр бактериальных клеток – $2.5 \cdot 10^5 \text{ КОЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$. Инкубацию осуществляли при температуре 36 ± 2 °С в течение 18 ч. Значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) оценивали по истечении времени инкубации по минимальной величине, при которой отсутствует видимый рост гриба или бактерии. Полученные значения МПК сравнивали со стандартными противогрибковыми (флуконазол) и антибактериальными (хлорамфеникол) препаратами, а также

контролировали микробиологическую чистоту исходных и полученных соединений (исследовали растворы образцов без инокулята), антимикробную активность ДМСО (исследовали растворы инокулята без образцов) и осуще-

ствляли контроль роста исследуемых грибов и бактерий (исследовали растворы инокулята без ДМСО и образцов).

Литература

1. V.M. Dembitsky, T.A. Glorizova, V.V. Poroikov
Nat. Prod. Biopros., 2017, 7, 151.
DOI: 10.1007/s13659-016-0117-3.
2. S. Benkhaya, S. M'rabet, A. El Harfi
Heliyon, 2020, 6, e03271. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03271.
3. Y. Qu, S.P. Babailov
J. Mater. Chem. A, 2018, 6, 1915. DOI: 10.1039/C7TA09593G.
4. M.-Y. Zhao, Y.-F. Tang, G.-Z. Han
Molecules, 2023, 28, 6741. DOI: 10.3390/molecules28186741.
5. B.V. Lyalin, V.L. Sigacheva, V.A. Kokorekin, V.A. Petrosyan
Tetrahedron Lett., 2018, 59, 2741.
DOI: 10.1016/j.tetlet.2018.05.089.
6. B.V. Lyalin, V.L. Sigacheva, A.S. Kudinova, S.V. Neverov, V.A. Kokorekin, V.A. Petrosyan
Molecules, 2021, 26, 4749. DOI: 10.3390/molecules26164749.
7. R.E. Frank, D.N. Hume
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 1736. DOI: 10.1021/ja01103a509.
8. F. Cataldo
J. Inorg. Organomet. Polym., 1997, 7, 35.
DOI: 10.1023/a:1021613801254.
9. Н.А. Семина, С.В. Сидоренко, С.П. Резван, С.Л. Грудинина, Л.С. Страчунский, О.У. Стецюк, Р.С. Козлов, М.В. Эйдельштейн, Е.А. Ведьмина, Л.Г. Столярова, И.В. Власова, З.С. Середа
Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия, 2004, 6(4), 306.
10. M07. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (11th Edn), USA, PA, Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018, 91 pp.
11. M27. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts* (4th Edn), USA, PA, Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017, 33 pp.
12. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3.2 *Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Conidia Forming Moulds*, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2020, 23 pp.
(https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9.3.2_Mould_testing_definitive_revised_2020.pdf).

English

Electro-Oxidative Thiocyanidation of Azopyrazoles *

Anastasia S. Kudinova

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS
47 Leninsky Ave., Moscow, 119991, Russia
ana_kudinova@mail.ru

Vera L. Sigacheva

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS
47 Leninsky Ave., Moscow, 119991, Russia
siga@ioc.ac.ru

Ekaterina D. Siling

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS
47 Leninsky Ave., Moscow, 119991, Russia
kate720@yandex.ru

Boris V. Lyalin

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS
47 Leninsky Ave., Moscow, 119991, Russia
lyalin@ioc.ac.ru

Natalia V. Gorpichenko

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,
MOH RF, (Sechenov University)
96 bld.1 Vernadsky Ave., Moscow, 119571, Russia
Gorpinchenko_n_v@staff.sechenov.ru

Vladimir A. Kokorekin

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS
47 Leninsky Ave., Moscow, 119991, Russia
vakokorekin@ioc.ac.ru

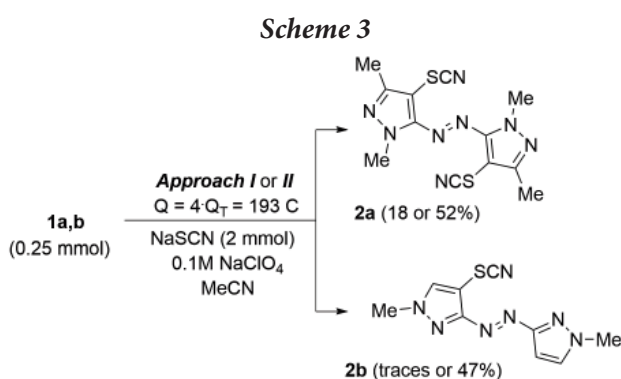
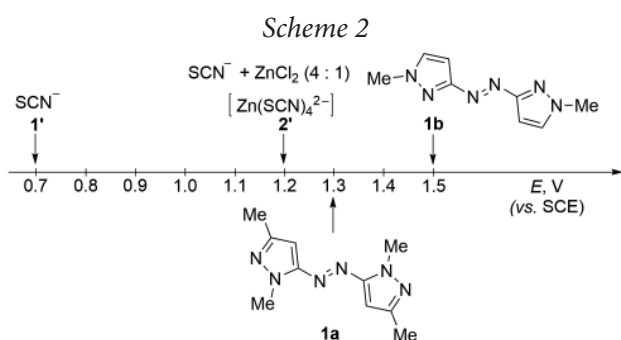
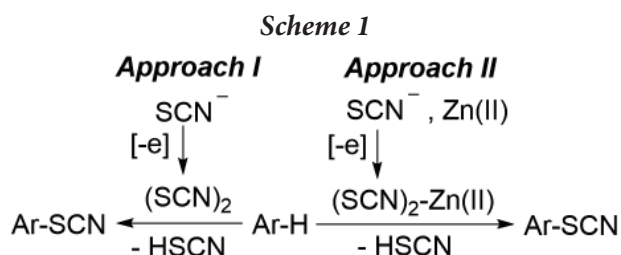
Abstract

The possibility of electrooxidative C—H functionalization of azopyrazoles was demonstrated for the first time on the example of their mono- and dithiocyanation under mild conditions with a yield of 47–52%. The main patterns of the process were studied and the antifungal activity of the resulting products was revealed, comparable to or superior to the antifungal drug fluconazole.

Keywords: azo compounds, thiocyanation, electrosynthesis, voltammetry, antifungal activity.

*The work was financially supported by RFBR (project 19-29-08027).

Images & Tables



Approach I: $E_{\text{anode}} = 0.7 \text{ V (vs. SCE)}$
Approach II: ZnCl_2 (0.5 mmol), $E_{\text{anode}} = 1.2 \text{ V}$

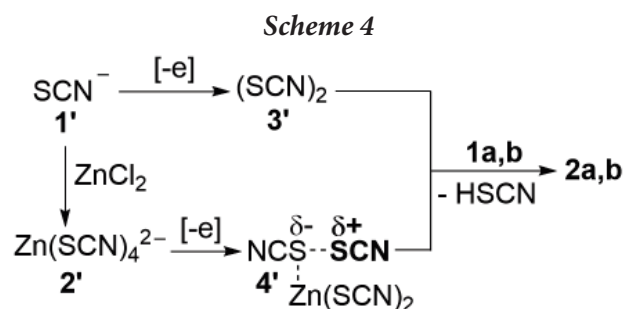


Table 1. Evaluation of antifungal and antibacterial activity of the initial and obtained compounds in comparison with standard drugs

Compound	Minimum inhibitory concentration (MIC, µg·ml ⁻¹)			
	Fungi		Bacteria	
	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1a	>500	>500	>500	>500
2a	8.0	32.0	125	125
1b	>500	>500	>500	>500
2b	8.0	8.0	64	250
Fluconazole	8.0	125.0	>500	>500
Chloramphenicol	>500	>500	4.0	1.0

References

- V.M. Dembitsky, T.A. Glorizova, V.V. Poroikov *Nat. Prod. Biopros.*, 2017, 7, 151. DOI: 10.1007/s13659-016-0117-3.
- S. Benkhaya, S. M'rabet, A. El Harfi *Heliyon*, 2020, 6, e03271. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03271.
- Y. Qu, S.P. Babailov *J. Mater. Chem. A*, 2018, 6, 1915. DOI: 10.1039/C7TA09593G.
- M.-Y. Zhao, Y.-F. Tang, G.-Z. Han *Molecules*, 2023, 28, 6741. DOI: 10.3390/molecules28186741.
- B.V. Lyalin, V.L. Sigacheva, V.A. Kokorekin, V.A. Petrosyan *Tetrahedron Lett.*, 2018, 59, 2741. DOI: 10.1016/j.tetlet.2018.05.089.
- B.V. Lyalin, V.L. Sigacheva, A.S. Kudina, S.V. Neverov, V.A. Kokorekin, V.A. Petrosyan *Molecules*, 2021, 26, 4749. DOI: 10.3390/molecules26164749.
- R.E. Frank, D.N. Hume *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 1736. DOI: 10.1021/ja01103a509.
- F. Cataldo *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 1997, 7, 35. DOI: 10.1023/a:1021613801254.
- N.A. Semina, S.V. Sidorenko, S.P. Rezvan, S.L. Grudinina, L.S. Strachunsky, O.U. Stetsiuk, R.S. Kozlov, M.V. Eidel'Shtein, E.A. Ved'Mina, L.G. Stolyarova, I.V. Vlasova, Z.S. Sereda *Clin. Mikrobiol. Antimikrob. Chimioter. [Klinicheskaa Mikrobiologia i Antimikrobnaa Himioterapija]*, 2004, 6(4), 306 (in Russian).
- M07. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (11th Edn), USA, PA, Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018, 91 pp.
- M27. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts* (4th Edn), USA, PA, Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017, 33 pp.
- EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3.2 Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Conidia Forming Moulds, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2020, 23 pp. (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9.3.2_Mould_testing_definitive_revised_2020.pdf).