

УДК 547.792.1 : 547.792.6 : 615.332

**Фізер М.М.**, к.х.н., викл.; **Фізер О.І.**, м.н.с.; **Девіняк О.Т.**, к.фарм.н., доц.;  
**Сливка М.В.**, к.х.н., доц.; **Лендел В.Г.**, д.х.н., проф.

## СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ 2-(5-АМІНО-4-ФЕНІЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛСУЛЬФАНІЛ)АЦЕТОГІДРАЗИДУ ЯК АНАЛОГА ІЗОНІАЗИДУ

ДВНЗ «Ужгородський національний університет», 88000, м. Ужгород, вул. Підгірна, 46  
e-mail: mmfizer@rambler.ru

На сьогоднішній день в Україні актуальним є питання лікування туберкульозу (ТБ), який за останнє десятиліття набув характеру епідемії. Швидкий розвиток резистентності мікобактерії туберкульозу до поширених антибіотиків є однією з основних перепон у лікуванні цього захворювання. Випадки цього захворювання збільшуються не тільки в Україні але і у всьому світі, частково це зумовлено ТБ/ВІЛ пандемією, що значно збільшує імовірність розвитку ТБ у відкриту форму. Окрім цього, розвиток резистентних штамів сприяє неефективності класичного лікування, тому розробка нових протимікробних агентів є надзвичайно актуальною задачею.

Серед великої кількості засобів хіміотерапії особливе місце займають похідні 1,2,4-триазолу, які вже знайшли застосування у якості медичних препаратів, це насамперед: *анастрозол* – інгібітор ароматази, застосовується для лікування раку грудей [1]; *різатриптан* використовується для лікування головних болів та мігрень, так як є агоністом 5-НТ<sub>1</sub> рецепторів [2]; *деферазірокс* проявляє високу хелатуючу здатність до іонів заліза [3]; *флуконазол* – протигрибковий агент [4]. В літературі описано, що похідні триазолів можуть проявляти проти-туберкульозні властивості [5]. Також було показано, що більшу активність проявляють сполуки, які містять аміногрупу, крім того, ще кращі результати було отримано при використанні сполук з гідразидним фрагментом [6]. Базуючись на цьому, було синтезовано 2-(5-аміно-4-феніл-1,2,4-триазол-3-ілсульфаніл) ацетогідразид, який містить вищенаведені фармакофори і було оцінено його подібність до відомого проти-туберкульозного засобу *ізоніазид*.

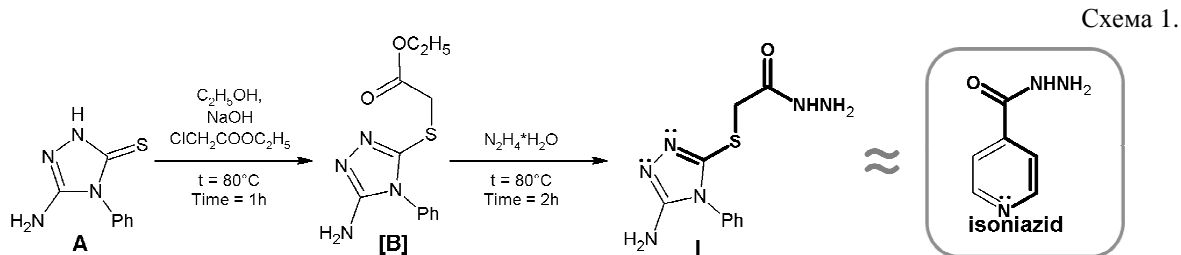
### Результати та їх обговорення

Синтез сполуки **I** проводили виходячи з 5-аміно-1,2,4-триазол-3-тіону **A**, через стадію селективного алкілювання по атому Сульфуру етиловим естером хлороцтової кислоти в лужному середовищі. Далі проводили гідразиноліз отриманого похідного **B**, без попереднього виділення, в тій же реакційній суміші (схема 1).

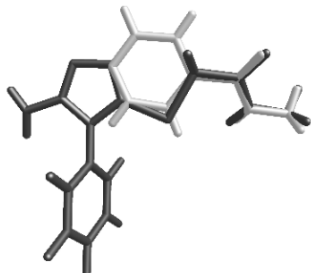
Отримана структура **I** містить фармакофорний меркаптоацетилгідразидний фрагмент, а також аміногрупу в положеннях 3 та 5 триазольного циклу, відповідно.

На перший погляд, подібність до ізоніазиду не дуже помітна, однак при детальному розгляді структури цих двох сполук, окрім наявності у обох гідразидного фрагменту, було додатково відмічено наявність схожих ланок, які містять саму гідразидну групу, спряжений карбоновий ланцюг (або не спряжену метиленмеркапто-групу) та атом Нітрогену у відповідному гетероциклі (на схемі 1 виділено жирним).

Атоми Нітрогену в положеннях 1 та 2 триазольного циклу є донорами електронів, так як і Нітроген піридинового циклу в молекулі ізоніазиду. Було проведено порівняння геометричних параметрів цих двох молекул. Структуру ізоніазиду було взято з рентгеноструктурного дослідження описаного в літературі [7]. Геометрія сполуки **I** була розрахована теоретично з використанням гібридного функціоналу B3LYP в базисі SV(P). На рис. 1 представлено порівняння двох структур з накладання саме схожих структурних фрагментів, для яких середньоквадратичне відхилення у випадку подібних ланок складає всього 0.222.

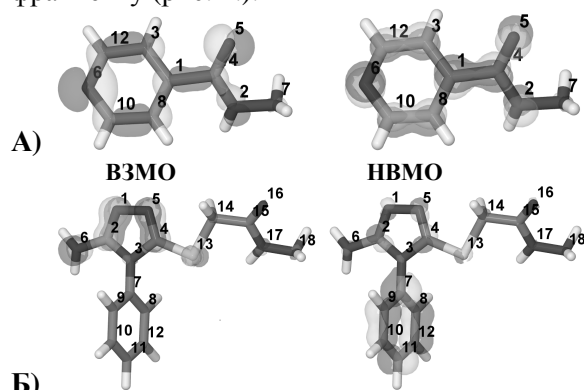


Слід відмітити що окрім практично однакових довжин зв'язків в гідразидній групі, відстані від циклічного Нітрогену до аміногрупи гідразиду в сполуці **I** складає 6.48Å, в ізоніазиді – 6.45Å, що свідчить про тотожність розмірів цих фрагментів. А незначна різниця у відстані між циклічним Нітрогеном та Оксигеном карбонільної групи (в сполуці **I**  $d_{N-O} = 5.24\text{Å}$ , в ізоніазиді 5.01Å) вказує на дуже незначну різницю у дієдральному куті гідразидного фрагменту та подібними ланками.



**Рис. 1.** Порівняння структури сполуки **I** (чорний) та ізоніазиду (білий). RMSD=0.222.

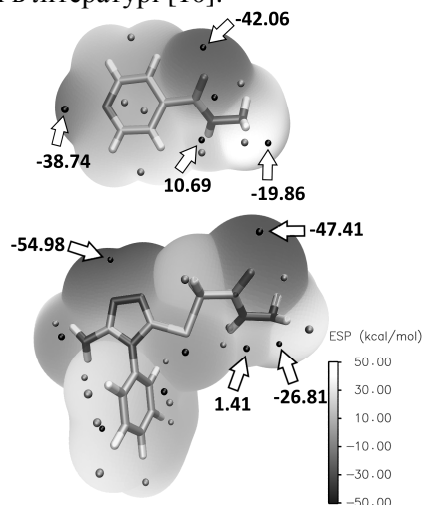
Аналіз фронтальних молекулярних орбіталей (а саме ВЗМО) дає змогу зробити висновок, що і у випадку ізоніазиду, і у випадку триазолу **I**, взаємодія з кислотними центрами (або електрофілами) у білку мішені проходить саме по циклічному атому Нітрогену, а не по аміногрупі гідразидного фрагменту (рис. 2.).



**Рис. 2.** Фронтальні молекулярні орбіталі ізоніазиду (А) та триазолу **I** (Б).

Така селективність була описана на прикладі солей ізоніазиду з неорганічними кислотами, в яких в першу чергу протонується саме піридиновий Нітроген [8]. Така специфічність може бути пояснена більшою основністю піридинового фрагменту ( $pK_{a1}(N_{\text{cycle}}) = 1.75$  для зв'язаної кислоти) порівняно з гідразидним ( $pK_{a2}(NH_2) = 3.57$ ;  $pK_{a3}(CONH) = 10.75$ ) [9].

Аналіз електростатичного потенціалу (ЕСП) двох молекул також свідчить на користь однозначної схожості між ними. На рис. 3. представлено екстремуми ЕПС на поверхні Ван дер Ваальса. Слід відзначити, що мінімуми в областях аміногрупи ( $ESP(I) = 26.81$  ккал/моль;  $ESP(iso) = -19.86$  ккал/моль), карбонільної групи ( $ESP(I) = -47.41$  ккал/моль;  $ESP(iso) = -42.06$  ккал/моль) та гетероциклічного Нітрогену ( $ESP(I) = -54.98$  ккал/моль;  $ESP(iso) = -38.74$  ккал/моль) дуже близькі за значенням, а отже для них буде характерна в певній мірі однакова електростатична взаємодія з білковими мішенями. Також в обох молекулах мінімум в області амідного Нітрогену має додатне значення і у випадку дуже сильних основ амідна група може проявляти кислотні властивості, що є описаним в літературі [10].

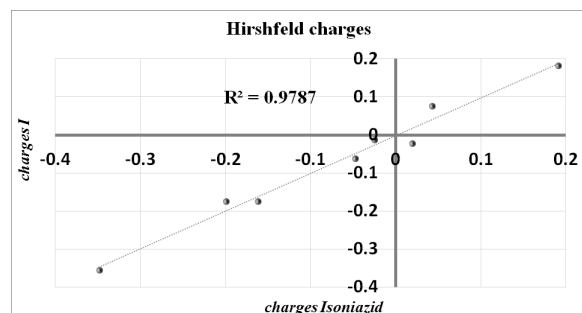


**Рис. 3.** Електростатичний потенціал ізоніазиду та триазолу **I** (позначено критичні мінімуми).

Важливою характеристикою є не тільки ЕСП, який показує взаємодію молекули з оточенням, але і часткові атомні заряди, які є характеристикою перерозподілу електронної густини в самій молекулі. Тому було проаналізовано часткові заряди по Хіршфельду, для подібних ланок молекул (табл. 1), і як видно, для обох молекул значення часткових зарядів в межах фармакофорного фрагменту, мають майже однакові значення з високою кореляцією ( $R^2=0.9787$ , рис. 4), а отже має місце практично однаковий перерозподіл електронної густини, що є додатковим доказом подібності цих структур.

**Таблиця 1.** Часткові заряди по Хіршфельду для подібних ланок молекул ізоніазиду та триазолу I

Ізоніазид Атом	Заряд	I Атом	Заряд
7 N	<b>-0.161760</b>	18 N	<b>-0.173393</b>
2 N	-0.047975	17 N	-0.061857
4 C	0.191207	15 C	0.182189
5 O	<b>-0.348484</b>	16 O	<b>-0.354490</b>
1 C	0.019402	14 C	-0.022293
8 C	-0.025299	13 S	-0.012417
10 C	0.042805	4 C	0.076799
6 N	<b>-0.199194</b>	5 N	<b>-0.173493</b>



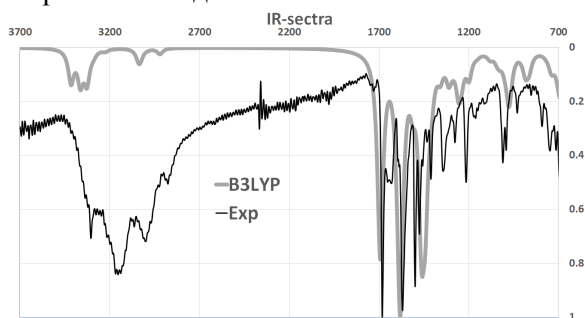
**Рис. 4.** Кореляція між частковими зарядами на відповідних атомах для молекул ізоніазиду та триазолу I.

Така подібність триазолу I до ізоніазиду дає передумови для дослідження даної речовини у якості протитуберкульозного агенту – аналогу, ізоніазиду. Комп'ютерне моделювання біологічної активності для солуки I за допомогою програми PASS [11] також прогнозує високу імовірність прояву саме протитуберкульозної та муколітичної активності на рівні ізоніазиду (табл. 2).

**Таблиця 2.** Прогнозована протитуберкульозна активність (згідно програми PASS)

Активність	Триазол I		Ізоніазид	
	Pa	Pi	Pa	Pi
Antituberculosic	0,810	0,003	0,813	0,003
Antimycobacterial	0,804	0,004	0,801	0,004

Окрім безпосереднього порівняння двох сполук важливим є безпосереднє дослідження самого триазолу I. В даній роботі ми використали наближення в теорії DFT – D3-B3LYP/SV(P) і в якості валідації даного методу можна провести порівняння експериментального та розрахованого ІЧ-спектрів триазолу I (рис. 5). В експериментальному ІЧ-спектрі, найінтенсивнішими є піки при  $1470\text{ cm}^{-1}$  (коливання в триазольному циклі  $\text{C}=\text{N}_{\text{cycle}}$ ),  $1500\text{ cm}^{-1}$  (коливання гідразидної групи  $\text{NH}-\text{CO}$ ),  $1570\text{ cm}^{-1}$  (для зв'язку  $\text{C}_{\text{cycle}}-\text{NH}_2$ ),  $1680$  (пік карбонільної групи), та  $3140-3300\text{ cm}^{-1}$  (коливання між Нітрогеном та відповідним Гідрогеном). Для коректування теоретичного спектру було використано коефіцієнт масштабування рівний 0.95, відповідні значення у випадку розрахованого ІЧ-спектру складають:  $1442\text{ cm}^{-1}$ ,  $1463\text{ cm}^{-1}$ ,  $1582\text{ cm}^{-1}$ ,  $1693\text{ cm}^{-1}$ , та  $3225-3415\text{ cm}^{-1}$ . Хороше співпадіння цих двох спектрів свідчить про адекватність результатів отриманих нами для даної сполуки в межах обраної нами теоретичної моделі.



**Рис. 5.** Порівняння експериментального і розрахованого ІЧ-спектрів триазолу I.

Також для теоретичного дослідження реакційної здатності синтезованого триазолу I розраховували значення конденсованої функції Фукуї [12]. Для цього проведено порівняння значення часткових зарядів для нейтральної молекули I, а також катіону та аніону (табл. 3).

Нуклеофільна атака імовірніше за все проходить за участю атомів Карбону 9, 10, 12 фенольного кільця в положення *орто*- та *мета*- по відношенню до триазольного циклу, що узгоджується з аналізом НВМО (рис. 2). Атака м'якими електрофілами найбільш імовірна по Сульфуру, а також по 1, 5 та 6, атомах Нітрогену, що також узгоджується з аналізом ВЗМО. Слід відзначити, що прогнозування найімовірнішої атаки електрофілом по Сульфуру, а протонування по триазольному Нітрогену не є суперечливим, так як протон є надзвичайно жорстким електрофілом, а функція Фукуї розроблена Парром [12] є адекватним реакційним дескриптором, в більшості випадків, лише для м'яких електрофілів чи нуклеофілів. У випадку ж радикальної атаки прогнозованим є перебіг процесів за участю Сульфуру, що в хорошому узгодженні з відомими реакціями окиснення R-меркаптопохідних гетероциклічних систем.

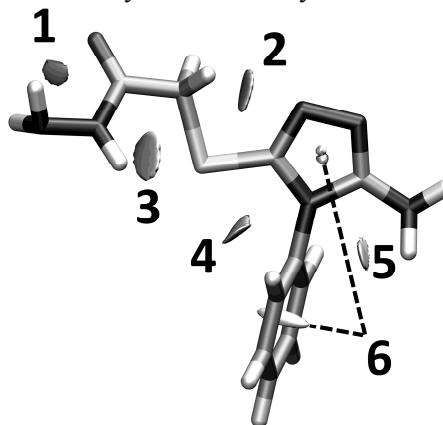
**Таблиця 3.** Значення конденсованої функції Фукуї для триазолу I

Атом	$f^+$	$f^-$	$f^0$
1 N	0.025412	<b>0.133861</b>	0.079637
2 C	0.007693	0.068587	0.03814
3 N	-0.00263	0.018996	0.008184
4 C	0.006595	0.062466	0.034531
5 N	0.02558	<b>0.10421</b>	0.064895
6 N	0.008563	<b>0.114595</b>	0.061579
7 C	0.036755	-0.01147	0.012641
8 C	0.082569	0.004121	0.043345
9 C	<b>0.121458</b>	0.004489	0.062974
10 C	<b>0.105772</b>	0.013527	0.05965
11 C	0.063298	0.018866	0.041082
12 C	<b>0.130405</b>	0.013331	0.071868
13 S	0.029165	<b>0.205328</b>	<b>0.117247</b>
14 C	0.01511	0.017089	0.0161
15 C	0.007824	0.004548	0.006186
16 O	0.016586	0.023984	0.020285
17 N	0.003261	0.005632	0.004447
18 N	0.004533	0.011565	0.008049

Примітка.  $f^+$  - атака нуклеофільним реагентом;  $f^-$  - електрофілом;  $f^0$  - радикальна атака.

Аналіз слабких нековалентних взаємодій в самій молекулі I було проведено методом зменшення градієнту густини (RDG – Reduced Density Gradient) [13], як це реалізовано в програмі Multiwfn [14]. На

рис. 6 представлено різні види взаємодій, які були знайдені у відповідному наближенні.



**Рис. 6.** RDG для полуки I.

У сульфаніл ацетогідрозидному фрагменті чітко спостерігаються два види водневого зв'язку, це  $\text{NH}_2 \cdots \text{OC}$  (позначений 1) та  $\text{OCNH} \cdots \text{S}$  (позначений 3). Також, очевидно через сильний електрон-акцепторний вплив Сульфуру та карбонільної групи, C-H зв'язок в метиленовій групі є достатньо поляризованим аби утворювався водневий зв'язок  $\text{CH}_2 \cdots \text{N}_{\text{цикл}}$ , який позначений 2. Також спостерігаються дисперсійні взаємодії між фенольним кільцем та Сульфуром (4) і аміногрупою (5). Також даний метод абсолютно правильно знаходить циклічні системи з слабким типом взаємодій всередині кільця, що позначено цифрою 6 на рисунку.

## Висновки

Отже, синтезований 2-(5-аміно-4-феніл-1,2,4-триазол-3-ілсульфаніл)ацетогідрозид (I) має структурну та електронну схожість з протитуберкульозним засобом ізоніазид, що було нами підтверджено за допомогою цілого ряду теоретичних методів. Програма PASS також прогнозує для триазолу I протитуберкульозну активність на рівні ізоніазиду, тому очевидно, що подальша робота в дослідженні активності сполуки I на біоматеріалі є необхідною і перспективною. Крім того, відомо що похідні ізоніазиду, а саме фтивазид, який легко синтезувати конденсацією активної гідрозидної аміногрупи з альдегідом, також проявляє протитуберкульозну активність. Тому синтез основ Шиффа на основі триазолу I також є в

перспективі наших подальших досліджень, особливо враховуючи можливість конденсації як по гідразидній групі, так і по аміногрупі в положенні 5 триазольного циклу.

### Експериментальна частина

Розчиняють 0,05 моль триазолу **A** в 50 мл етанолу, який містить 0,055 моль гідроксиду натрію. Додають 0,055 моль 2-хлороетилацетату і одержану суміш нагрівають на водяній бані протягом 1 год. Охолоджують, і осад хлориду натрію, що утворився, відфільтровують. До маточного розчину додають 0,06 моль гідразин гідрату і суміш кип'яють протягом 2 год. Розчинник упарюють, а твердий залишок перекристалізують з водного етанолу. Вихід 58%.  $T_{пл} = 148-149^{\circ}\text{C}$ . ІЧ-спектр (FT-IR, ZnSe,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3100-3250 (N-H), 1680 (C=O), 1350-1580(триазол). ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 3.58 (2H, с,  $\text{CH}_2$ ), 4.28 (2H, м,  $\text{NH}_2$ -гідразид), 5.73 (2H, с,  $\text{NH}_2$ -триазол); 7.36-7.58 (5H, м,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 9.22 (1H, с,  $\text{NHCO}$ ).

Знайдено, %: С 45.51; Н 4.71; N 31.67; S 11.98.  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ .

Розраховано, %: С 45.44; Н 4.58; N 31.80; S 12.13.

**Теоретичні розрахунки.** Початкову геометрію для сполуки **I** було згенеровано програмою Avogadro [15] в силовому полі MMFF94. За допомогою конформаційного аналізу, серед 5183 можливих конформерів було обрано найстабільніший, для якого було проведено оптимізацію геометричних параметрів з функціоналом B3LYP в базисі SV(P) з дисперсійними поправками D3BJ [16, 17]. Для прискорення розрахунків було використано RIJCOSX метод. Для моделювання впливу біологічного середовища було використано континуальну модель COSMO (діелектрична проникність рівна 4 для моделювання білку). Для оптимізованої геометрії проводили розрахунок гессіану для підтвердження знаходження локального мінімуму. Оптимізацію молекули ізоніазиду не проводили: було використано результати рентгеноструктурних досліджень описаних в літературі [7]. Розрахунок молекулярних орбіталей,

часткових зарядів, ЕСП проводили з трьох-експоненційним базисним набором TZVP.

Розрахунки геометрії та хвильових функцій проводили в програмі ORCA [18], аналіз хвильових функцій та розрахунок ЕСП проводили в програмі Multiwfn [14]. Візуалізація здійснена в програмах VMD [19] та Jmol [20].

Публікація містить результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом Ф-63/94-2016 Державного фонду фундаментальних досліджень.

### Список використаних джерел

1. Howell A., Cuzick J., Baum M., Buzdar A., Dowsett M., Forbes J.F., Hocht-Boes G., Houghton J., Locker G. Y., Tobias J.S., Atac Trialists' G. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *The Lancet*. 2005, 365(9453), 60–62.
2. Wellington K., Plosker G.L. Rizatriptan: An update of its use in the management of migraine. *Drugs*. 2002, 62(10), 1539–1574.
3. Yang L.P., Keam S.J., Keating G.M. Deferasirox: a review of its use in the management of transfusional chronic iron overload. *Drugs*. 2007, 67(15), 2211–2230.
4. Diflucan (Australian Approved Product Information). Pfizer Australia Pty Ltd. West Ryde (NSW): *Pfizer Australia*, 2004.
5. Kandemirli F., Shvets N., Unsalan S., Kuçukguzel I., Rollas S., Kovalishyn V., Dimoglo A. The structure – antituberculosis activity relationships study in a series of 5-(4-aminophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione derivatives. A combined electronic-topological and neural networks approach. *Med. Chem*. 2006, 49, 415–422.
6. Shiradkar M.R., Murahari K.K., Gangadasu H.R., Suresh T., Kalyan C.A., Panchal D., Kaur R., Burange P., Ghogare J., Mokale V., Raut M. Synthesis of new S-derivatives of clubbed triazolyl thiazole as anti-Myco bacterium tuberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem*. 2007, 15, 3997–4008.
7. Swapna B., Maddileti D., Nangia A. Cocrystals of the Tuberculosis Drug Isoniazid: Polymorphism, Isostructurality, and Stability. *Crystal Growth & Design*. 2014, 14(11), 5991–6005.
8. De Melo C.C., Carvalho P. de S. Jr., Diniz L.F., D'Vries R.F., Ayala A.P., Ellena J. Supramolecular synthesis and thermochemical investigations of pharmaceutical inorganic isoniazid salts. *Cryst. Eng. Comm*. 2016, 18, 6378–6388.

9. Serjeant E.P., Dempsey B. Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Chemical Data Series No. 23. New York, New York: Pergamon Press. Inc., 1979, P. 989.
10. Bagno A., Comuzzi C. Deprotonation of Amides and Polyfunctional Imides Probed by Heteronuclear NMR and Quantum Chemical Calculations. *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 287–295.
11. <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>.
12. Yang W., Parr R.G. Hardness, softness, and the Fukui function in the electronic theory of metals and catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985, 82(20), 6723–6726.
13. Johnson E.R., Keinan S., Mori-Sanchez P., Contreras-Garcia J., Cohen A.J., Yang W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 6498–6506.
14. Lu T., Chen F., Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comp. Chem.* 2012, 33, 580–592.
15. Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.XX. <http://avogadro.openmolecules.net/>
16. Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* 2010, 132, 154104.
17. Grimme S., Ehrlich S., Goerigk L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 1456–1465.
18. Neese F. The ORCA program system. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2012, 2(1), 73–78.
19. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD - visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics.* 1996, 14, 33–38.
20. Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>.

Стаття надійшла до редакції: 13.09.2016.

## SYNTHESIS AND THEORETICAL STUDY OF 2-[(5-AMINO-4-PHENYL-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)SULFANYL]ACETOHYDRAZIDE AS AN ANALOGUE OF ISONIAZID

**Fizer M.M., Fizer O.I., Devinyak O.T., Slivka M.V., Lendel V.G.**

2-[(5-Amino-4-phenyl-1,2,4-triazol-3-yl)sulfanyl]acetohydrazide **I** was synthesized and its structure was determined and confirmed with spectral methods (NMR, FT-IR) and with elemental analysis. The new triazole **I** was theoretically investigated for its similarity to a well known drug isoniazid. Similar fragments between these two molecules were established and electrostatic potential, partial atomic charges and Fukui function were analysed. The reactivity of the synthesized triazole was predicted and the most likely reactive sites based on nucleophilic, electrophilic or radical attack were determined. We calculated intramolecular noncovalent interaction and defined several types of Hydrogen bond in triazole **I**.