

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



Рік заснування – 1966

**ЖУРНАЛ
ОРГАНІЧНОЇ ТА
ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ХІМІЇ**

—  —
**JOURNAL
OF ORGANIC AND
PHARMACEUTICAL CHEMISTRY**

—  —
**ЖУРНАЛ
ОРГАНИЧЕСКОЙ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

2015 – том 13, випуск 4 (52)

Харків
НФаУ

Головні редактори В.І.Кальченко (Київ)
В.П.Черних (Харків)
Заступники головного редактора І.С.Гриценко (Харків)
М.В.Вовк (Київ)
Відповідальні секретарі Т.А.Костіна (Харків)
Т.І.Таранушина (Київ)

Редакційна колегія:

П.О.Безуглий (Харків), М.К.Братенко (Чернівці), В.С.Броварець (Київ),
Ж.Ф.Буйон (Руан, Франція), З.В.Войтенко (Київ), В.А.Георгіянц (Харків),
О.І.Гризодуб (Харків), В.А.Загорій (Київ), С.М.Коваленко (Харків),
С.І.Коваленко (Запоріжжя), В.М.Ковальов (Харків), М.І.Короткіх (Київ),
Р.Б.Лесик (Львів), В.В.Ліпсон (Харків), В.П.Новіков (Львів),
М.Д.Обушак (Львів), П.П.Онисько (Київ), В.Ю.Пашинник (Київ),
О.Б.Смолій (Київ), В.М.Тимошенко (Київ), А.О.Толмачов (Київ),
І.В.Українець (Харків), А.А.Фокін (Київ), Л.А.Шемчук (Харків),
Ю.Л.Ягупольський (Київ)

Редакційна рада:

С.А.Андронаті (Одеса), І.С.Антипін (Казань), О.М.Біловол (Харків),
О.О.Варнек (Страсбург, Франція), Б.С.Зіменковський (Львів),
Г.Л.Камалов (Одеса), А.Катц (Берклі, США), В.П.Кухар (Київ),
А.Хаас (Бохум, Німеччина), В.А.Чебанов (Харків), Ю.Г.Шермолович (Київ)

У журналі розглянуті проблеми синтезу та аналізу органічних та елементоорганічних сполук, аналогів природних сполук і лікарських субстанцій, результати фізико-хімічних досліджень у вищезазначених напрямках.

Для працівників науково-дослідних установ, вищих навчальних закладів та фахівців хімічного, фармацевтичного, біологічного, медичного і сільськогосподарського профілю.

“Журнал органічної та фармацевтичної хімії” за рішенням ВАК України внесено до переліку видань, рекомендованих для публікації матеріалів дисертацій зі спеціальностей: органічна хімія, елементоорганічна хімія, фармацевтична хімія і фармакогнозія (хімічні науки — постанова ВАК №1-05/1 від 10.02.2010 р.; фармацевтичні науки — постанова ВАК №1-05/2 від 10.03.2010 р.).

Затверджено до друку Вченою радою Інституту органічної хімії НАН України, протокол №19 від 23.11.2015 р.

Затверджено до друку Вченою радою Національного фармацевтичного університету, протокол №3 від 30.11.2015 р.

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, Національний фармацевтичний університет, редакція “Журналу органічної та фармацевтичної хімії”, тел./факс (57) 706-30-63. E-mail: press@nuph.edu.ua

Передплатні індекси: для індивідуальних передплатників — 08383, для підприємств — 08384

Свідоцтво про державну реєстрацію серії КВ №7392 від 05.06.2003 р.

Підписано до друку 17.12.2015 р. Формат 60x84 1/8.

Папір офсетний. Друк ризо. Умовн. друк. арк. 9,3. Обліков.-вид. арк. 10,76. Тираж 100 прим.

Літературні редактори — О.Ю.Гурко, А.Л.Краснікова. Комп'ютерна верстка — О.М.Білинська.

Видавництво Національного фармацевтичного університету

“Журнал органічної та фармацевтичної хімії”. Том 13, випуск 4 (52), 2015

ISSN 2308-8303

© Національний фармацевтичний університет, 2015

UDC 541.398.1 + 547.569.4 + 547.745

THE SYNTHESIS OF 1,5-DIARYL-4-ARYLTHIOPYRROLIDIN-2-ONES BY ARYLSULFENYLATION OF STYRYL ACETIC ACID N-ARYLAMIDES

N.M.Tsyzoryk, I.Yu.Danyliuk, A.I.Vaskevych*, R.I.Vaskevych, M.V.Vovk

Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Science of Ukraine
5, Murmanska Str., 02660, Kyiv, Ukraine. E-mail: mvovk@ioch.kiev.ua

*National Technical University of Ukraine "KPI"

Key words: styryl acetic acid amides; electrophilic intramolecular cyclization; arylsulfenyl chlorides; pyrrolidin-2-ones

The role of the electrophilic intramolecular cyclization (EIC) reaction of unsaturated carboxylic acid amides has been described for the design of arylthio-containing lactams and lactones. In order to identify the effect of the styryl moiety on regioselectivity of the electrophilic intramolecular cyclization process styryl acetic acid amides with electron-donating substituents in para-position of the styryl moiety have been studied. It has been found that these compounds react with phenyl and p-tolylsulfenylchlorides in nitromethane in the presence of lithium perchlorate as a "doping additive" to form 1,5-diaryl-4-arylthiopyrrolidin-2-ones with the yield of 60-66%. It is most likely that the reaction found includes the formation of the episulfonium cation stabilized by the perchlorate-anion followed by 5-endo-cyclization onto the nitrogen atom of the amide group. The structure of the compounds synthesized has been confirmed by their spectral parameters. In particular, the IR-spectra contain strong absorption bands C=O at 1703-1703 cm⁻¹, and ¹H NMR-spectra of the compounds obtained are characterized by two protons multiple shifts of the H³ pyrrolidine ring at 2.52-2.64 and 3.08-3.22 ppm, respectively, H⁴ proton multiple shifts at 3.61-3.76 ppm and H⁵ at 4.99-5.09 ppm. Formation of the pyrrolidine ring as a result of cyclization has been reliably proven by ¹³C NMR-spectra with the typical signals of carbon atoms: C³ (37 ppm), C⁴ (48 ppm), C⁵ (69 ppm) and C² (172 ppm).

СИНТЕЗ 1,5-ДІАРИЛ-4-АРИЛТІОПІРОЛІДИН-2-ОНІВ РЕАКЦІЄЮ АРИЛСУЛЬФЕНІЛЮВАННЯ N-АРИЛАМІДІВ СТИРИЛОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

Н.М.Цизорик, І.Ю.Данилюк, А.І.Васькевич, Р.І.Васькевич, М.В.Вовк

Ключові слова: аміднi стирилоцтової кислоти; електрофільна внутрішньомолекулярна циклізація; арилсульфенілхлориди; піролідин-2-они

Підкреслена роль реакції електрофільної внутрішньомолекулярної циклізації (ЕВЦ) амідів ненасичених карбонових кислот для побудови сульфаніловмісних лактамних та лактонних структур. З метою виявлення впливу стирильного фрагмента на регіоселективність процесу електрофільної внутрішньомолекулярної циклізації досліджено ряд анілідів стирилоцтових кислот із донорними замісниками в пара-положенні арильного ядра. Встановлено, що вказані сполуки реагують із феніл- та пара-толілсульфенілхлоридами в середовищі нітрометану в присутності еквімолярної кількості перхлорату літію як «допінг-добавки» із утворенням 1,5-діарил-4-арилтіопіролідин-2-онів із виходами 60-66%. Найвірогідніше, що знайдена реакція реалізується за схемою утворення стабілізованого перхлорат-аніоном епісульфонієвого катіона із подальшою 5-ендо-циклізацією на атом азоту амідної групи. Структура синтезованих сполук підтверджена їх спектральними параметрами. Зокрема, в ІЧ-спектрах присутні інтенсивні смуги поглинання груп С=О при 1703-1705 см⁻¹. Спектри ЯМР ¹Н характеризуються двома мультиплетами протонів Н³ піролідинового циклу відповідно при 2.52-2.64 та 3.08-3.22 м.ч., а також мультиплетами протонів Н⁴ при 3.61-3.76 м.ч. та Н⁵ при 4.99-5.09 м.ч. Формування в результаті циклізації піролідинового ядра надійно доведено спектрами ЯМР ¹³С із типовими сигналами атомів вуглецю: С³ (37 м.ч.), С⁴ (48 м.ч.), С⁵ (69 м.ч.) та С² (172 м.ч.).

СИНТЕЗ 1,5-ДИАРИЛ-4-АРИЛТІОПИРОЛІДИН-2-ОНОВ РЕАКЦИЕЙ АРИЛСУЛЬФЕНИЛИРОВАНИЯ N-АРИЛАМИДОВ СТИРИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Н.М.Цизорик, И.Ю.Данилюк, А.И.Васькевич, Р.И.Васькевич, М.В.Вовк

Ключевые слова: амиды стирилуксусной кислоты; электрофильная внутримолекулярная циклизация; арилсульфенилхлориды; пирролидин-2-оны

Подчеркнута роль реакции электрофильной внутримолекулярной циклизации (ЭВЦ) амидов непредельных карбоновых кислот для построения сульфанилсодержащих лактамных и лактонных структур. С целью выявления влияния стирильного фрагмента на региоселективность процесса ЭВЦ исследован ряд анилидов стирилуксусных кислот с донорными заместителями в пара-положении арильного ядра. Установлено, что указанные соединения реагируют с фенил- и пара-толилсульфенилхлоридами в среде нитрометана в присутствии эквивалентного количества перхлората лития как «допинг-добавки» с образованием 1,5-диарил-4-арилтиопирролидин-2-онов с выходами 60-66%. Наиболее вероятно, что найденная реакция реализуется по схеме образования стабилизированного перхлорат-анионом эписульфониевого катина с последующей 5-ендо-цикллизацией на атом азота амидной группы. Структура синтезированных соединений подтверждена их спектральными параметрами. В частности, в ИК-спектрах присутствуют интенсивные полосы поглощения групп С=О при 1703-1705 см⁻¹. Спектры ЯМР ¹Н характеризуются двумя мультиплетами протонов Н³ пирролидинового цикла соответственно при 2.52-2.64 и 3.08-3.22 м.ч., а также мультиплетами протонов Н⁴ при 3.61-3.76 м.д. и Н⁵ при 4.99-5.09 м.д. Формирование в результате циклизации пиридинового ядра надежно доказано спектрами ЯМР ¹³С с типичными сигналами атомов углерода: С³ (37 м.д.), С⁴ (48 м.д.), С⁵ (69 м.д.) и С² (172 м.д.).

4-Thio-functionalized γ -lactams (pyrrolidine-2-ones) are important building blocks in the synthesis of carbapenems – β -lactam antibiotics with a wide spectrum of action. Obtaining compounds of this type described in literature is based on multistage transformations of methyl aspartate [1] or dimethyl 3-hydroxyglutamate [2]. Taking into consideration the biological and synthetic potential of pyrrolidine-2-one compounds [3-6] the problem of developing effective ways to obtain new derivatives, in particular, suitable to various modifications of arylsulfanyl groups is urgent today. The results of our previous studies indicate that the electrophilic intramolecular cyclization of unsaturated carboxylic acids amides using arylsulfenyl chlorides is a convenient method for designing arylthio-containing lactam and lactone compounds [7-9]. The electrophilic intramolecular cyclization reaction of styryl acetic acid amides containing substituents of a different electronic nature in the amide moiety shows the possibility of formation of benzazepin-2-one, lactam and lactone products [10, 11]. It seemed quite reasonable to study the effect of electron-donating groups in the aryl ring of the alkenyl moiety on regioselectivity of this process. Thanks to this purpose, a number of styryl acetic acid amides **1a-d** containing electron-donating substituents (Me, *i*-Pr, or *tert*-Bu) in *p*-position of the aryl ring have been synthesized. It has been determined that these anilides react with phenyl- or *p*-tolyl sulfenyl chlorides **2a,b** in nitromethane in the presence of an equimolar amount of lithium perchlorate as a “doping additive” [11, 12] to form 1,5-diaryl-4-arylthiopyrrolidin-2-ones **3a-f** in a good (60-66%) yield. The results obtained indicate regioselectivity of the intramolecular cyclization on the nitrogen atom of the amide moiety. It is logical to assume that the process is implemented under the scheme, which contains the predominant formation of the episulfonium intermediate **A** stabilized by the perchlorate-anion followed by 5-*endo*-cyclization onto the nitrogen atom of the amide group. It should be noted that electron-donating aryl substituents better stabilize intermediate **A** and create favourable conditions for a nitrogen atom to attack a soft episulfonium cation (Scheme).

The structures of compounds **3a-f** have been confirmed by spectral data. In particular, IR-spectra contain the intense absorption band of C=O groups in 1703-1705 cm^{-1} . In ^1H NMR-spectra of two protons the multiple shifts of the H^3 pyrrolidine ring were observed at 2.52-2.64 and 3.08-3.22 ppm, respectively, and H^4 proton multiple shifts at 3.61-3.76 ppm and H^5 at 4.99-5.09 ppm. Formation of the pyrrolidine ring as a result of cyclization has been reliably proven by ^{13}C NMR-spectra with the typical signals of carbon atoms: C^3 (37 ppm), C^4 (48 ppm), C^5 (69 ppm), C^2 (172 ppm).

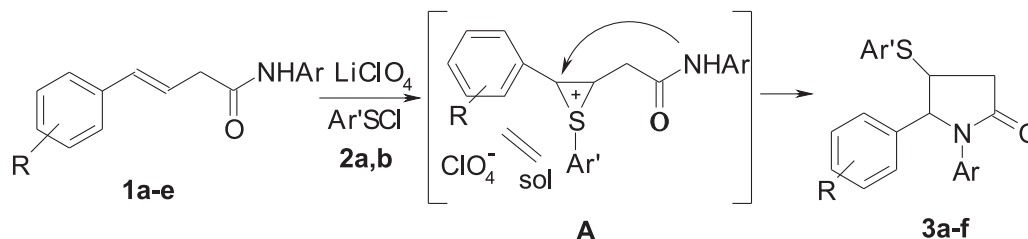
Experimental Part

IR-spectra were recorded on a Vertex 70 spectrophotometer in KBr tablets. ^1H and ^{13}C NMR-spectra were registered on a Varian VXR-400 spectrometer (399.97 and 125.74 MHz, respectively); TMC was used as an internal standard. HPLC-MS measurements were performed on an Agilent 1100\DAD\HSD\VLG 119562 instrument.

The general method for the synthesis of 1,5-aryl-4-arylthiopyrrolidin-2-ones 3a-f. To the mixture of 2 mmol of amide **1a-1d** and 2 mmol of lithium perchlorate in 10 mL of nitromethane add dropwise the solution of 2 mmol of arylsulfenyl chloride **2a-2b** in 6 mL of nitromethane while stirring at room temperature. Stir the reaction mixture for 10 h and evaporate under vacuum. Crystallize the solid residue from ethanol.

5-(4-Methylphenyl)-1-phenyl-4-(phenylthio)pyrrolidin-2-one 3a. Yield – 64%, oil. ^1H NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 2.27 s (3H, CH_3), 2.54-2.64 m (1H, CH), 3.10-3.21 m (1H, CH), 3.66-3.72 m (1H, CH), 5.04 d (1H, CH, J 2 Hz), 6.92-7.45 m (14HAr). ^{13}C NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 21.07 (CH_3), 37.52 (C^3), 48.30 (C^4), 69.82 (C^5), 122.13, 125.22, 125.71, 128.17, 128.78, 129.35, 129.85, 132.95, 133.16, 136.15, 138.07, 138.18 (C_{Ar}), 172.36 (C^2). Mass spectrum: m/z 360.0 [$M+1$] $^+$. Found, %: C 76.88; H 5.85; N 3.93. $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NOS}$. Calculated, %: C 76.84; H 5.89; N 3.90. M 359.5.

5-(4-Methylphenyl)-4-[(4-methylphenyl)thio]-1-phenylpyrrolidin-2-one 3b. Yield – 60%. M.p. –



- 1: Ar = Ph, 4-Me (a), 4-*i*-Pr (b), 4-*tert*-Bu (c); Ar = 4-MeC₆H₄, R = 4-*tert*-Bu (d); 2: Ar' = Ph (a), 4-MeC₆H₄ (b);
 3: R = 4-Me, Ar = Ph, Ar' = Ph (a), 4-MeC₆H₄ (b); R = 4-*i*-Pr, Ar = Ph, Ar' = Ph (c), 4-MeC₆H₄ (d);
 R = 4-*tert*-Bu, Ar = Ph, Ar' = Ph (e), 4-MeC₆H₄ (f).

Scheme

116-117°C. IR-spectrum, ν , cm^{-1} : 1705 (C=O). ^1H NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 2.29 s (3H, CH_3), 2.36 s (3H, CH_3), 2.54-2.64 m (1H, CH), 3.08-3.19 m (1H, CH), 3.61-3.66 m (1H, CH), 4.99-5.04 m (1H, CH), 6.95 d (2H_{Ar}, J 7.8 Hz), 7.04-7.40 m (11H_{Ar}). ^{13}C NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 21.09 (CH_3), 21.20 (CH_3), 37.50 (C^3), 48.63 (C^4), 69.65 (C^5), 122.02, 125.09, 125.73, 128.73, 129.27, 129.81, 130.12, 133.61, 136.27, 137.98, 138.28, 138.59 (C_{Ar}), 172.51 (C^2). Mass spectrum: m/z 374.2 [$M+1$]⁺. Found, %: C 77.22; H 6.24; N 3.72. $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NOS}$. Calculated, %: C 77.17; H 6.21; N 3.75. M 373.5.

5-(4-Isopropylphenyl)-1-phenyl-4-(phenylthio)pyrrolidin-2-one 3c. Yield – 66%. M.p. – 114-115°C. IR-spectrum, ν , cm^{-1} : 1703 (C=O). ^1H NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 1.18 d (6H, 2 CH_3 , J 3.6 Hz), 2.55-2.60 m (1H, CH), 2.75-2.90 m (1H, CH), 3.09-3.22 m (1H, CH), 3.66-3.76 m (1H, CH), 5.00-5.09 m (1H, CH), 6.93-7.47 m (14H_{Ar}). ^{13}C NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 23.86 (CH_3), 23.92 (CH_3), 33.69 (C^{Pr-i}), 37.41 (C^3), 48.28 (C^4), 69.68 (C^5), 121.97, 125.10, 125.66, 127.20, 128.12, 128.82, 129.31, 132.89, 133.25, 136.38, 138.31, 148.92 (C_{Ar}), 172.36 (C^2). Mass spectrum: m/z 388.2 [$M+1$]⁺. Found, %: C 77.54; H 6.47; N 3.62. $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NOS}$. Calculated, %: C 77.48; H 6.50; N 3.61. M 387.5.

5-(4-Isopropylphenyl)-4-[(4-methylphenyl)thio]-1-phenylpyrrolidin-2-one 3d. Yield – 63%. M.p. – 99-100°C. IR-spectrum, ν , cm^{-1} : 1704 (C=O). ^1H NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 1.18 d (6H, 2 CH_3 , J 6.8 Hz), 2.34 s (3H, CH_3), 2.52-2.60 m (1H, CH), 2.77-2.89 m (1H, CH), 3.09-3.15 m (1H, CH), 3.63-3.65 m (1H, CH), 5.02-5.07 m (1H, CH), 6.93-7.42 m (13H_{Ar}). ^{13}C NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 21.23 (CH_3), 23.80 (CH_3), 23.89 (CH_3), 33.77 (C^{Pr-i}), 37.39 (C^3), 48.58 (C^4), 69.58 (C^5), 121.92, 125.02, 125.59, 127.15, 128.69, 129.37, 130.07, 133.56, 136.49, 138.37, 138.55, 148.84 (C_{Ar}), 172.46 (C^2). Mass spectrum: m/z 402.2 [$M+1$]⁺. Found,

%: C 77.80; H 6.72; N 3.50. $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NOS}$. Calculated, %: C 77.77; H 6.78; N 3.49. M 401.5.

5-(4-tert-Butylphenyl)-1-(4-methylphenyl)-4-(phenylthio)pyrrolidin-2-one 3e. Yield – 66%. M.p. – 162-163°C. IR-spectrum, ν , cm^{-1} : 1703 (C=O). ^1H NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 1.25 s (9H, 3 CH_3), 2.24 s (3H, CH_3), 2.54-2.58 m (1H, CH), 3.10-3.19 m (1H, CH), 3.69-3.71 m (1H, CH), 5.00-5.04 m (1H, CH), 6.96 d (2H_{Ar}, J 8Hz), 7.04 d (2H_{Ar}, J 8Hz), 7.23-7.35 m (7H_{Ar}), 7.41-7.45 m (2H_{Ar}). ^{13}C NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 20.82 (CH_3), 31.23 ($\text{CH}_3^{\text{tert-But}}$), 34.56 ($\text{C}^{\text{tert-But}}$), 37.34 (C^3), 48.23 (C^4), 69.74 (C^5), 122.14, 125.38, 126.03, 128.11, 129.31, 129.37, 132.89, 133.35, 134.93, 135.72, 136.11, 151.14 (C_{Ar}), 172.30 (C^2). Mass spectrum: m/z 416.2 [$M+1$]⁺. Found, %: C 78.05; H 7.01; N 3.40. $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NOS}$. Calculated, %: C 78.03; H 7.03; N 3.37. M 415.5.

5-(4-tert-Butylphenyl)-4-[(4-methylphenyl)thio]-1-phenylpyrrolidin-2-one 3f. Yield – 62%. M.p. – 149-150°C. IR-spectrum, ν , cm^{-1} : 1704 (C=O). ^1H NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 1.25 s (9H, 3 CH_3), 2.34 s (3H, CH_3), 2.53-2.62 m (1H, CH), 3.09-3.20 m (1H, CH), 3.61-3.68 m (1H, CH), 5.03-5.07 m (1H, CH), 6.92-7.41 m (13H_{Ar}). ^{13}C NMR-spectrum (CDCl_3), δ , ppm.: 21.15 (CH_3), 31.27 ($\text{CH}_3^{\text{tert-But}}$), 34.55 ($\text{C}^{\text{tert-But}}$), 37.39 (C^3), 48.55 (C^4), 69.68 (C^5), 122.03, 125.14, 125.36, 126.01, 128.80, 129.34, 130.07, 133.54, 135.95, 138.26, 138.55, 151.17 (C_{Ar}), 172.72 (C^2). Mass spectrum: m/z 416.2 [$M+1$]⁺. Found, %: C 78.08; H 7.00; N 3.34. $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NOS}$. Calculated, %: C 78.03; H 7.03; N 3.37. M 415.5.

Conclusions

The effective method for the synthesis of 1,5-dialkyl-4-arylthiopyrrolidin-2-ones based on the arylsulfenylation reaction of N-arylamides of styryl acetic acids containing electron-donating substituents in the aryl ring of the styryl moiety has been developed.

References

1. Seki M., Yamanaka T., Kondo K. *J. Org. Chem.*, 2000, Vol. 65, pp.517-522.
2. Kobayashi S., Kobayashi K., Hirai K. *Synlett*, 1999, pp.909-912.
3. Joie C., Deckers K., Enders P. *Synthesis*, 2014, Vol. 46, pp.799-808.
4. Pelletier S. M.-C., Ray P. C., Dixon D. J. *Org. Lett.*, 2009, Vol. 11, pp.4512-4515.
5. Anderson J. C., Horsfall L. R., Kalogirou A. S., Mills M. R., Stepney G. J., Tizzard G. J. *J. Org. Chem.*, 2012, Vol. 77, pp.6186-6198.
6. Heinrich D. M., Flanagan J. U., Jamieson S. M. F., Silva S., Rigoreay L. J., Trivier E., Raynkom T., Turnbull A. P., Penny W. A. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, Vol. 62, pp.738-744.
7. Tsizorik N. M., Vaskevich A. I., Rusanov E. B., Staninets V. I., Vovk M. V. *Russ. J. Org. Chem.*, 2011, Vol. 47, pp.1146-1152.
8. Tsizorik N. M., Vaskevich A. I., Rusanov E. B., Staninets V. I., Vovk M. V. *Russ. J. Org. Chem.*, 2012, Vol. 48, pp.193-201.
9. Tsizorik N. M., Vaskevich A. I., Rusanov E. B., Rozhenko A. B., Vovk M. V. *Russ. J. Org. Chem.*, 2014, Vol. 50, pp.1397-1408.
10. Tsizorik N. M., Vaskevich A. I., Staninets V. I., Rusanov E. B., Vovk M. V. *Russ. J. Org. Chem.*, 2012, Vol. 48, pp.1536-1543.
11. Zefirov N. S., Smith V. A., Bodrikov I. V., Krimer M. Z. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1978, Vol. 240, pp.858-860.
12. Krimer M. Z., Smith B. A., Shamshurin A. A. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1973, Vol. 209, pp.866-866.
13. Tsizorik N. M., Vaskevich A. I., Vaskevich R. I., Vovk M. V. *Russ. J. Org. Chem.*, 2015, Vol. 51, p.226.
14. Vaskevich A. I., Tsizorik N. M., Staninets V. I., Rusanov E. B., Vovk M. V. *Russ. J. Org. Chem.*, 2012, Vol. 48, p.1536.

Надійшла до редакції 07.11.2015 р.

UDC 54.057:542.951.1:547.831.9:615.28:616.441: 615.212

METHYLATION OF POSITION 8 IN THE PYRIDINE MOIETY OF THE *N*-(BENZYL)-2-HYDROXY-4-OXO-4*H*-PYRIDO [1,2-*a*]PYRIMIDINE-3-CARBOXAMIDE MOLECULE AS AN ATTEMPT TO ENHANCE THEIR ANALGESIC PROPERTIES

I.V.Ukrainets, O.V.Gorokhova, L.V.Sydorenko, S.G.Taran

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine
53, Pushkinska Str., Kharkiv, 61002. E-mail: uiv-2@mail.ru

Key words: amidation; tricarbonylmethane heterocyclic derivatives; 2-hydroxy-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides; synthesis; chemical modification; analgesic activity

The chemical modification of the pyridine moiety of the molecule – displacement of the methyl group in position 8 of pyrido[1,2-*a*]pyrimidine nucleus has been considered as one of the possible versions to optimize the biological properties of *N*-(benzyl)-2-hydroxy-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides. The synthesis of the research targets was carried out by the reaction of the corresponding benzylamines and ethyl 2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxylate, in its turn obtained by condensation of 2-amino-4-methylpyridine (i.e. the product with the methyl group in the intentionally required position) and triethyl methanetricarboxylate. The structure of the compounds obtained has been confirmed by the data of elemental analysis and NMR ¹H spectroscopy, and in the case of optically active 1-phenylethylamides additionally by polarimetry. The study of the analgesic properties of all *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides was performed on the standard experimental “acetic acid writhing” model. At the same time, it has been found that our modification is accompanied with the increased biological activity of exclusively *para*-substituted derivatives. For profound research 4-fluorobenzylamide exceeding Piroxicam and Nabumetone by the level of the specific effect has been recommended as a potential new analgesic.

МЕТИЛЮВАННЯ ПОЛОЖЕННЯ 8 ПІРИДИНОВОЇ ЧАСТИНИ МОЛЕКУЛИ *N*-(БЕНЗИЛ)-2-ГІДРОКСИ-4-ОКСО-4*H*-ПІРИДО[1,2-*a*]ПІРИМІДИН-3-КАРБОКСАМІДІВ ЯК СПРОБА ПОСИЛЕННЯ ЇХ АНАЛГЕТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

I.V.Українець, O.V.Горохова, Л.В.Сидоренко, С.Г.Таран

Ключові слова: амідування; гетероциклічні похідні трикарбонілметану; 2-гідрокси-4-оксо-4*H*-піридо[1,2-*a*]піримідин-3-карбоксаміди; синтез; хімічна модифікація; анальгетична активність

Як один з можливих варіантів оптимізації біологічних властивостей *N*-(бензил)-2-гідрокси-4-оксо-4*H*-піридо[1,2-*a*]піримідин-3-карбоксамідів розглянуто хімічну модифікацію піридинової частини їх молекули – переміщення метильної групи у положення 8 піридо[1,2-*a*]піримідинового ядра. Синтез цільових об'єктів дослідження здійснено реакцією відповідних бензиламінів з етил-2-гідрокси-8-метил-4-оксо-4*H*-піридо[1,2-*a*]піримідин-3-карбоксилатом, у свою чергу, одержаним конденсацією 2-аміно-4-метилпіридину (тобто продукту з метильною групою в завідомо необхідному положенні) з триетилметантрикарбоксилатом. Будову синтезованих речовин підтверджено даними елементного аналізу та спектроскопії ¹H ЯМР, а у випадку оптично активних 1-фенілетиламідів додатково ще й поляриметрично. Вивчення анальгетичних властивостей усіх *N*-(бензил)-2-гідрокси-8-метил-4-оксо-4*H*-піридо[1,2-*a*]піримідин-3-карбоксамідів проведено на стандартній експериментальній моделі оцтовокислих корчів. При цьому знайдено, що здійснена нами модифікація супроводжується посиленням біологічної активності виключно *para*-заміщених похідних. Для поглиблених випробувань як новий потенційний анальгетик рекомендовано 4-фторобензиламід, який перевищує за рівнем специфічного ефекту Піроксикам та Набуметон.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ 8 ПИРИДИНОВОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ *N*-(БЕНЗИЛ)-2-ГИДРОКСИ-4-ОКСО-4*H*-ПИРИДО[1,2-*a*]ПИРИМИДИН-3-КАРБОКСАМИДОВ КАК ПОПЫТКА УСИЛЕНИЯ ИХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

I.V.Українець, O.V.Горохова, Л.В.Сидоренко, С.Г.Таран

Ключевые слова: амидирование; гетероциклические производные трикарбонилметана; 2-гидрокси-4-оксо-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-3-карбоксамиды; синтез; химическая модификация; анальгетическая активность

В качестве одного из возможных вариантов оптимизации биологических свойств *N*-(бензил)-2-гидрокси-4-оксо-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-3-карбоксамидов рассмотрена химическая модификация пиридинової части их молекулы – перемещение метильной группы в положение 8 пиридо[1,2-*a*]пиримидинового ядра. Синтез целевых объектов исследования осуществлен реакцией соответствующих бензиламинов с этил-2-гидрокси-8-метил-4-оксо-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-3-карбоксилатом, в свою очередь, полученным конденсацией 2-амино-4-метилпиридина (т. е. продукта с метильной группой в заведомо требуемом положении) с триэтилметантрикарбоксилатом. Строение синтезированных веществ подтверждено данными элементного анализа и спектроскопии ¹H ЯМР, а в случае оптически активных 1-фенілетиламидов дополнительно еще и поляриметрически. Изучение анальгетических свойств всех *N*-(бензил)-2-гидрокси-8-метил-4-оксо-4*H*-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-3-карбоксамидов проведено на стандартной экспериментальной модели уксуснокислых корчей. При этом найдено, что предпринятая нами модификация сопровождается усилением биологической активности исключительно *para*-замещенных производных. Для углубленных испытаний в качестве нового потенциального анальгетика рекомендован 4-фторобензиламід, превосходящий по уровню специфического эффекта Піроксикам и Набуметон.

Different versions of the chemical modification of biologically active substances and auxiliary materials used in medicine up to now remain one of the most effective and, most importantly, almost easily feasible methods to improve their pharmacological and/or pharmaceutical properties [1]. This methodology has long been successfully used by medicinal chemists to intensify the specific action [2, 3], increase selectivity towards a particular receptor [4-6], improve the thermal stability [7], biocompatibility [8], bioavailability [9], safety [10], correction of taste [11], as well as to solve many other problems [11-15] associated with optimization of both the known and newly developed drugs.

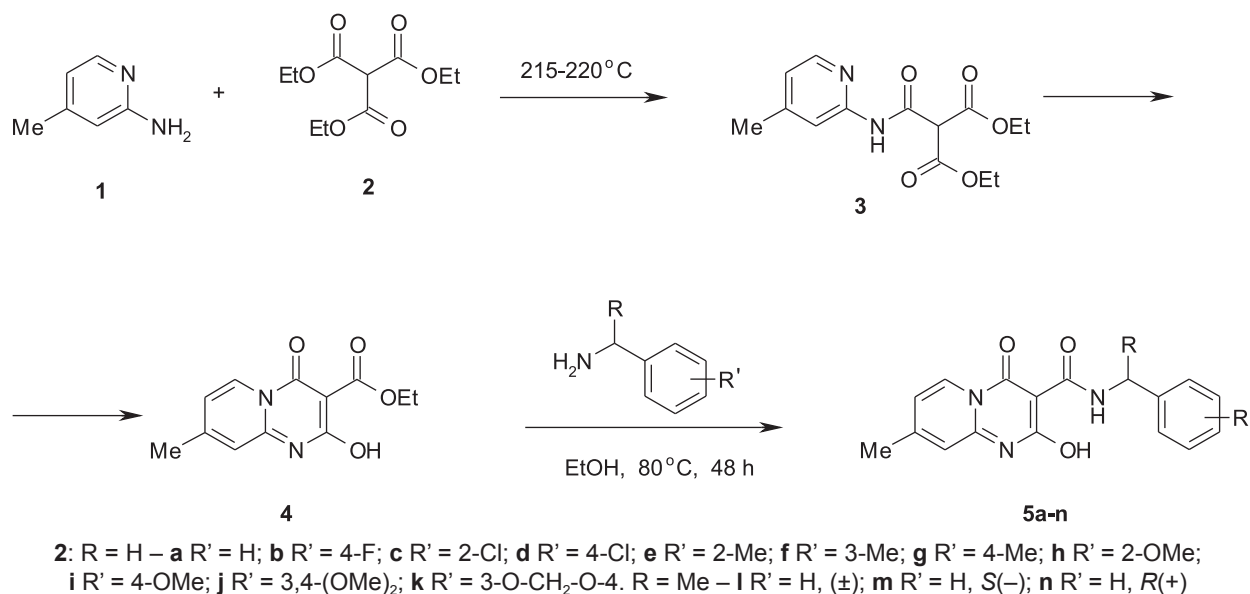
Taking into account these data and continuing our extensive research in searching new promising analgesics among amide derivatives of 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids [16] and structurally-related heterocyclic systems [17, 18] the present communication is devoted to *N*-(benzyl)-2-hydroxy-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides methylated in position 8 of the pyridopyrimidine nucleus. The relatively high analgesic properties recently discovered in *N*-(benzyl)-2-hydroxy-9-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides [19] were the theoretical background to involvement of these compounds to the range of the objects studied. A detailed analysis of the structure of these substances indicates that the attempt can be made to intensify their biological effect by the chemical modification of the pyridine moiety of the molecule bicyclic base, namely by displacement of the methyl group to another position, for example position 8.

It is clear that it is advisable to start the practical implementation of such a transformation with a product containing the methyl group in the intentionally required position – in this case it is a com-

mercially available 2-amino-4-methylpyridine (**1**). Condensation of this amine with triethyl methanetricarboxylate (**2**) through the intermediate monoamide (**3**) gives ethyl 2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxylate (**4**) [20] (see Scheme), the subsequent amidation of it leads to the target *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides (**5a-n**) with high yields and purity.

All of the *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides (**5a-n**) obtained are colourless crystalline substances with the narrow intervals of melting points (Table 1). At room temperature they are sparingly soluble in DMF and DMSO, slightly soluble in low alcohols and insoluble in water.

The structure of the compounds obtained has been confirmed by elemental analysis (Table 1) and ¹H NMR spectroscopy (Table 2). The signals of protons of 2-OH groups in the ¹H NMR spectra resonate in the weak field that is characteristic for enols – 15.91-15.63 ppm. The terminal amide groups are present in triplets common for them (or doublets in the case of 1-phenylethylamides **5l-n**) in the region of 9.98-9.82 ppm. The proximity of the proton in position 6 with an electronegative cyclic nitrogen atom causes its strong paramagnetic shift with respect to the other protons of the pyridine moiety (see Fig.). Interestingly, the resonance signals of protons of H-7 and H-9 in all *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides (**5a-n**) change places compared to those in the ¹H NMR spectrum of the starting ester (**4**) [20]. It is rather difficult to give an unambiguous explanation for this fact without more research since this effect was not observed in 9-methyl substituted isomers previously studied [19]. The signals of aromatic protons of arylalkylamide fragments, as a rule, are markedly shifted upfield and focused



Scheme

Table 1

Characteristics of benzylamides **5a-n**

Compound	Empirical formula	Found, %			M.p., °C	Yield, %
		Calculated, %				
		C	H	N		
5a	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₃	<u>66.12</u> 66.01	<u>4.80</u> 4.89	<u>13.52</u> 13.58	222-224	88
5b	C ₁₇ H ₁₄ FN ₃ O ₃	<u>62.29</u> 62.38	<u>4.37</u> 4.31	<u>12.92</u> 12.84	196-198	92
5c	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃ O ₃	<u>59.33</u> 59.40	<u>4.04</u> 4.10	<u>12.15</u> 12.22	203-205	94
5d	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃ O ₃	<u>59.45</u> 59.40	<u>4.03</u> 4.10	<u>12.28</u> 12.22	244-246	90
5e	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>66.91</u> 66.86	<u>5.36</u> 5.30	<u>12.95</u> 13.00	210-212	87
5f	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>66.77</u> 66.86	<u>5.23</u> 5.30	<u>13.07</u> 13.00	199-201	84
5g	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>66.82</u> 66.86	<u>5.33</u> 5.30	<u>13.11</u> 13.00	191-193	88
5h	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₄	<u>63.63</u> 63.71	<u>5.14</u> 5.05	<u>12.46</u> 12.38	186-188	89
5i	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₄	<u>63.79</u> 63.71	<u>5.12</u> 5.05	<u>12.30</u> 12.38	225-227	86
5j	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅	<u>61.88</u> 61.78	<u>5.25</u> 5.18	<u>11.44</u> 11.38	202-204	89
5k	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₅	<u>61.13</u> 61.19	<u>4.23</u> 4.28	<u>11.96</u> 11.89	238-240	95
5l	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>66.91</u> 66.86	<u>5.24</u> 5.30	<u>13.09</u> 13.00	170-172	80
5m*	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>66.77</u> 66.86	<u>5.42</u> 5.30	<u>13.12</u> 13.00	175-177	81
5n**	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	<u>66.82</u> 66.86	<u>5.39</u> 5.30	<u>12.93</u> 13.00	175-177	83

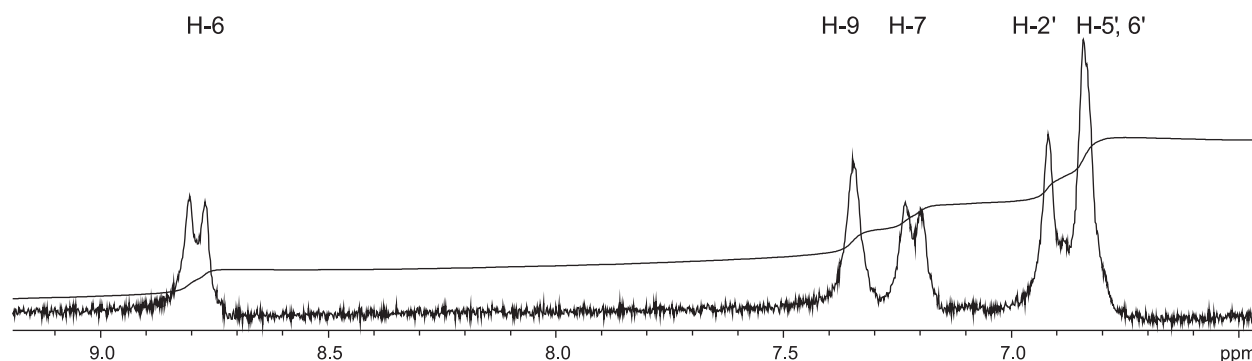
* $[\alpha]_D^{20} = +18.6$; $c = 5$; DMF.** $[\alpha]_D^{20} = -18.6$; $c = 5$; DMF.

on the narrow segments of spectra appearing often in the spectra by complex multiplets. Therefore, assignment of these signals to any particular benzylamide proton becomes difficult, if not impossible (Table 2). However, the need for such assignments is not obligatory – the total integrated intensity of these signals is enough to confirm the structure of the N-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-3-carboxamides (**5a-n**) studied.

As one should expect, chiral 1-phenylethylamides (**5m** and **5n**) have absolutely identical ¹H NMR spectra with the racemate (**5l**) and the same values of specific rotation differing only by signs (see Table 1 and 2). Since the total chemical individuality of enantiomeric substances is not a guarantee for their purity in the sense of stereochemistry, then in the case of 1-phenylethylamides (**5m** and **5n**) there is also a need to determine the optical purity. This is despite the fact that in their synthesis the optically

pure S (-) – and R(+)-1-phenylethylamines (see Experimental Part) having a high optical stability and being not susceptible to racemization during acylation were used [21]. It is due to the large number of diverse external factors that can cause racemization of chiral substances.

We tried to determine the enantiomeric purity of 1-phenylethylamides (**5m** and **5n**) using ¹H NMR spectroscopy and chiral lanthanide shift reagents (LSR). Depending on the purity of the sample under study their addition results in formation of one or two diastereomers, in which protons become magnetically nonequivalent. In its turn, it is easily determined by doubling of some signals in the ¹H NMR spectrum [22]. Unfortunately, our experiments have failed. Adding tris[3-(heptafluoropropyl)hydroxymethylene]-(+)-camphorato]europium(III) to the solutions of chiral 1-phenylethylamides (**5m** and **5n**) and even to their optically inactive racemic mixture (**5l**)

Fig. A fragment of the ^1H NMR spectra (signals of aromatic protons) of amide **5k**.

is not accompanied with duplication of any signals, it leads only to broadening of the majority of the spectral signals. This result is obviously caused by the strongly expressed acidic properties of the substances analyzed due to their 2-OH groups.

As it is known [21], obtaining of both antipodes with the same absolute value of the optical rotation can serve as a fairly reliable characteristic of the complete optical purity, especially if both enantiomers are obtained independently by using a variety of asym-

Table 2 ^1H NMR Spectra of benzylamides **5a-n**

Compound	Chemical shifts, δ , ppm (J , Hz)
5a	15.86 (1H, s, 2-OH); 9.93 (1H, t, $J = 6.0$, NH); 8.80 (1H, d, $J = 7.1$, H-6); 7.38-7.19 (7H, m, H-7.9 + Ph); 4.57 (2H, d, $J = 6.1$, CONHCH_2); 2.42 (3H, s, 8-Me)
5b	15.82 (1H, s, 2-OH); 9.92 (1H, t, $J = 6.1$, NH); 8.79 (1H, d, $J = 6.9$, H-6); 7.45-7.09 (6H, m, H-7.9 + H-3';5' + H-2';6'); 4.55 (2H, d, $J = 6.0$, CONHCH_2); 2.42 (3H, s, 8-Me)
5c	15.63 (1H, s, 2-OH); 9.98 (1H, t, $J = 6.0$, NH); 8.82 (1H, d, $J = 7.2$, H-6); 7.50-7.21 (6H, m, H-7.9 + H-3';4';5';6'); 4.65 (2H, d, $J = 6.1$, CONHCH_2); 2.43 (3H, s, 8-Me)
5d	15.79 (1H, s, 2-OH); 9.95 (1H, t, $J = 6.0$, NH); 8.81 (1H, d, $J = 7.1$, H-6); 7.43-7.33 (5H, m, H-9 + H-2';3';5';6'); 7.22 (1H, d, $J = 7.1$, H-7); 4.56 (2H, d, $J = 6.2$, CONHCH_2); 2.41 (3H, s, 8-Me)
5e	15.81 (1H, s, 2-OH); 9.82 (1H, t, $J = 5.6$, NH); 8.79 (1H, d, $J = 7.1$, H-6); 7.35 (1H, s, H-9); 7.28-7.13 (5H, m, H-7 + H-3';4';5';6'); 4.55 (2H, d, $J = 5.6$, CONHCH_2); 2.42 (3H, s, 8-Me); 2.31 (3H, s, 2'-Me)
5f	15.85 (1H, s, 2-OH); 9.88 (1H, t, $J = 5.9$, NH); 8.79 (1H, d, $J = 7.3$, H-6); 7.35 (1H, s, H-9); 7.25-7.03 (5H, m, H-7 + H-2';4';5';6'); 4.53 (2H, d, $J = 6.0$, CONHCH_2); 2.43 (3H, s, 8-Me); 2.27 (3H, s, 3'-Me)
5g	15.89 (1H, s, 2-OH); 9.89 (1H, t, $J = 5.5$, NH); 8.79 (1H, d, $J = 7.0$, H-6); 7.35 (1H, s, H-9); 7.22 (2H, d, $J = 7.7$, H-2';6'); 7.12 (2H, d, $J = 7.7$, H-3';5'); 4.52 (2H, d, $J = 5.5$, CONHCH_2); 2.41 (3H, s, 8-Me); 2.26 (3H, s, 4'-Me)
5h	15.86 (1H, s, 2-OH); 9.89 (1H, t, $J = 6.1$, NH); 8.81 (1H, d, $J = 7.3$, H-6); 7.34 (1H, s, H-9); 7.29-6.86 (5H, m, H-7 + H-3';4';5';6'); 4.53 (2H, d, $J = 6.0$, CONHCH_2); 3.85 (3H, s, OMe); 2.42 (3H, s, 8-Me)
5i	15.91 (1H, s, 2-OH); 9.83 (1H, t, $J = 5.7$, NH); 8.77 (1H, d, $J = 7.3$, H-6); 7.33 (1H, s, H-9); 7.27 (2H, d, $J = 8.9$, H-3';5'); 7.20 (1H, d, $J = 7.1$, H-7); 6.88 (2H, d, $J = 8.9$, H-2';6'); 4.49 (2H, d, $J = 5.7$, CONHCH_2); 3.71 (3H, s, OMe); 2.42 (3H, s, 8-Me)
5j	15.93 (1H, s, 2-OH); 9.84 (1H, t, $J = 5.6$, NH); 8.79 (1H, d, $J = 7.0$, H-6); 7.36 (1H, s, H-9); 7.22 (1H, d, $J = 7.2$, H-7); 6.98 (1H, s, H-2'); 6.94-6.83 (2H, m, H-5';6'); 4.49 (2H, d, $J = 5.6$, CONHCH_2); 3.72 (6H, s, OMe x 2); 2.41 (3H, s, 8-Me)
5k	15.87 (1H, s, 2-OH); 9.85 (1H, t, $J = 5.4$, NH); 8.78 (1H, d, $J = 6.8$, H-6); 7.35 (1H, s, H-9); 7.21 (1H, d, $J = 6.8$, H-7); 6.92 (1H, s, H-2'); 6.86-6.82 (2H, m, H-5';6'); 5.97 (2H, s, O-CH ₂ -O); 4.46 (2H, d, $J = 5.4$, CONHCH_2); 2.43 (3H, s, 8-Me)
5l	15.70 (1H, s, 2-OH); 9.93 (1H, d, $J = 7.0$, NH); 8.81 (1H, d, $J = 7.1$, H-6); 7.45-7.19 (7H, m, H-7.9 + Ph); 5.17 (1H, q, $J = 7.0$, CONHCH); 2.42 (3H, s, 8-Me); 1.51 (3H, d, $J = 7.0$, CH-Me)
5m	15.70 (1H, s, 2-OH); 9.93 (1H, d, $J = 7.0$, NH); 8.81 (1H, d, $J = 7.1$, H-6); 7.45-7.19 (7H, m, H-7.9 + Ph); 5.17 (1H, q, $J = 7.0$, CONHCH); 2.42 (3H, s, 8-Me); 1.51 (3H, d, $J = 7.0$, CH-Me)
5n	15.70 (1H, s, 2-OH); 9.93 (1H, d, $J = 7.0$, NH); 8.81 (1H, d, $J = 7.1$, H-6); 7.45-7.19 (7H, m, H-7.9 + Ph); 5.17 (1H, q, $J = 7.0$, CONHCH); 2.42 (3H, s, 8-Me); 1.51 (3H, d, $J = 7.0$, CH-Me)

metric reagents. Both the characteristics of 1-phenylethylamides themselves (**5m** and **5n**) and the conditions for their synthesis correspond to all these criteria. Therefore, there is every reason to consider these substances to be optically pure enantiomers.

In principle, the true spatial configuration of the substance and direction of rotation of the polarization plane are unrelated characteristics [21]. Therefore, rotation of the polarization plane by amides (**5m** and **5n**) in the opposite direction compared to the starting amines should be considered only as an interesting fact. Moreover, rotation of the configuration (especially the complete one) when acylating chiral 1-phenylethylamines is not observed [23].

The analgesic properties of the compounds synthesized were studied in full compliance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, and the Law of Ukraine No. 3447=IV "On protection of animals from cruel behaviour" (2006). During the study the experimental animals were kept on a standard diet with free access to food and water.

Screening tests were performed on nonlinear white male mice weighing 18-23 g on the standard experimental model of "acetic acid writhing" [24]. The nociceptive effect was reproduced by intraperitoneal injection of 0.6% solution of AcOH (0.1 ml per 10 g of the body weight) in 1 h after oral administration of the test sample. Observations of the animals were within 20 min by counting the number of "writhings". The assessment of the analgesic effect was carried out by the ability of test substances to reduce the number of "writhings" in comparison with the untreated control and expressed as a percentage (Table 3). The well-known non-narcotic analgesics Piroxicam and Nabumetone were used as the reference drugs. All *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides (**5a-n**) under study were introduced as a fine aqueous suspension stabilized with Tween-80 (20 mg/kg, orally). The reference drugs were introduced in the doses similar to their corresponding ED₅₀ for the experimental model used [25]. The control animals received an equivalent amount of water and Tween-80. Seven experimental animals were involved to obtain statistically reliable results (in this work the significance level of the confidence interval is taken as $p \leq 0.05$) in testing each of the compounds synthesized, reference drugs and control. Data from all biological tests were processed using the t-Student's test [26].

A detailed analysis of our experimental data (Table 3) shows a very interesting structural and biological regularity: displacement of the methyl group from position 9 of the pyrido [1,2-*a*] pyrimidine nucleus to position 8 is accompanied with a marked increase of the analgesic properties of exclusively *para*-substituted *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-

Table 3

The analgesic properties of benzylamides **5a-n**

Compound	Analgesic activity	
	Average amount of "acetic acid writhing"	%*
5a	38.9±1.7	51.1 (52.3)
5b	29.9±1.2	62.4 (31.5)
5c	57.5±3.3	27.6 (32.7)
5d	35.1±1.4	55.8 (51.2)
5e	71.2±3.8	10.3 (11.8)
5f	69.5±3.4	12.5 (17.1)
5g	53.0±2.6	33.2 (16.4)
5h	65.9±3.1	16.9 (26.7)
5i	40.7±1.9	48.7 (25.6)
5j	51.2±2.2	35.5 (42.4)
5k	61.7±3.0	22.3 (29.1)
5l	67.0±3.5	15.6 (18.2)
5m	66.5±3.3	16.3 (16.9)
5n	64.8±3.0	18.4 (17.5)
Piroxicam (92 mg/kg)	39.3±1.9	50.5
Nabumetone (50 mg/kg)	40.6±2.1	48.9
Control	79.4±2.7	–

* Figures in parentheses are the analgesic activity of the corresponding isomeric *N*-(benzyl)-2-hydroxy-9-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides studied under the same conditions [19].

oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides (**5b**, **5d**, **5g** and **5i**). Thus, the analgesic effect of the *ortho*- and *meta*-substituted derivatives remains nearly at the same level. There is also no effect of this modification on the activity of 1-phenylethylamides (**5l-n**), i.e. the presence of the methyl group in the methylene bridge separating the aromatic ring and the amide nitrogen atom should be clearly recognized as an undesirable factor.

Of the whole group *N*-(4-fluorobenzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamide (**5b**) is of particular interest; by the level of its analgesic action it substantially exceeds Piroxicam and Nabumetone in much lower dose. On this basis it can be recommended for profound pharmacological trials as a potential new analgesic.

Experimental Part

The ¹H NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-400 spectrometer (400 MHz) in DMSO-*d*₆ solution, the internal standard was TMS. Elemental analysis was carried out on a EuroVector EA-3000 microanalyzer. Melting points were determined in capillaries on a SMP10 Stuart digital melting point analyzer. The specific rotation of the optically active

amides **3m,n** was determined on a Polamat A polarimeter. These syntheses use commercially *S*(-) and *R*(+)-1-phenylethylamines from Fluka with an optical purity of at least 99.5%. The starting ethyl 2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxylate (**4**) was synthesized according to the literature procedure [20].

The general procedure of obtaining *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides (5a-n**).** Add 0.02 Mol of the corresponding benzylamine to the solution of 2.48 g (0.01 Mol) of ethyl 2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxylate (**2**) in 10-15 ml of EtOH and reflux for 30 h. Stop heating the reaction mixture, then cool and allow to stand at a temperature of about 0°C for 10-12 h. Filter the precipitate of benzylamide (**5a-n**) isolated,

first wash with a cold hexane, then with water and dry in the air. Crystallize from the mixture of DMF – ethanol (1:1).

Conclusions

1. For the purpose of the possible increase in analgesic properties the chemical modification of the compounds previously studied has been performed; as a result, the synthesis of a series of *N*-(benzyl)-2-hydroxy-8-methyl-4-oxo-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidine-3-carboxamides has been carried out.

2. According to the results of the pharmacological trials it has been found that in some cases displacement of the methyl group from position 9 of the pyridopyrimidine nucleus to position 8 is accompanied with a noticeable increase in the analgesic activity.

References

1. Kubinyi H. Rossiiskii Khimicheskii Zhurnal – Russian Chemical Journal, 2006, Vol. L, No.2, pp.5-17.
2. Xiong W, Ma X, Wu Y, Chen Y, Zeng L, Liu J, Sun W, Wang D, Hu Y. BMC Veterinary Research, 2015, No.11, pp.205. DOI: 10.1186/s12917-015-0459-9.
3. Kang Y. G., Park C. Y., Shin H., Singh R., Arora G., Yu C. M., Lee I. Y. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, Vol. 25, No.17, pp.3650-3653. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.06.060.
4. Weng X, Baez J. E., Khiterer M., Hoe M. Y., Bao Z., Shea K. J. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2015, Vol. 54, No.38, pp.11214-11218. DOI: 10.1002/anie.201504934.
5. Murakami T, Okamoto H., Kim H. Biomaterials Science, 2015, Vol. 3, No.5, pp.712-715. DOI: 10.1039/c4bm00402g.
6. Uchida S, Kataoka K, Itaka K. Pharmaceutics, 2015, Vol. 7, No.3, pp.137-151. DOI: 10.3390/pharmaceutics7030137.
7. Ahmed S. A., El-Shayeb N. M., Hashem A. G., Saleh S. A., Abdel-Fattah A. F. Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 2015, Vol. 46, No.1, pp.23-28. DOI: 10.1590/S1517-838246120120462.
8. Kirdponpattara S., Khamkeaw A., Sanchavanakit N., Pavasant P., Phisalaphong M. Carbohydrate Polymers, 2015, No.132, pp.146-155. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.06.059.
9. Du H., Liu M., Yang X., Zhai G. Journal of Colloid and Interface Science, 2015, No.460, pp.87-96. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.08.049.
10. Sureshbabu A. R., Kurapati R., Russier J., Ménard-Moyon C., Bartolini I., Meneghetti M., Kostarelou K., Bianco A. Biomaterials, 2015, No.72, pp.20-28. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.046.
11. Kuznetsov S. G., Chigareva S. M., Ramsh S. M. Itogi nauki i tekhniki. Organicheskaya Khimiya (The results of science and technology. Organic chemistry). Moscow, VINITI; 1991, Vol. 19, pp.25-54.
12. Fijałkowski K., Żywicka A., Drozd R., Niemczyk A., Junka A. F., Peitler D., Kordas M., Konopacki M., Szymczyk P., Fray M. E., Rakoczy R. Carbohydrate Polymers, 2015, No.133, pp.52-60. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.07.011.
13. Guilini C., Baehr C., Schaeffer E., Gizzi P., Rufi F., Haiech J., Weiss E., Bonnet D., Galzi J. L. Analytical Chemistry, 2015, Vol. 87, No.17, pp.8858-8866. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02100.
14. Morrison P. M., Foley P. J., Warriner S. L., Webb M. E. Chemical Communications (Cambridge, England), 2015, Vol. 51, No.70, pp.13470-13473. DOI: 10.1039/c5cc05469a.
15. Nilsen T. W. Cold Spring Harbor protocols, 2015, Vol. 2015, No.6, pp.599-603. DOI: 10.1101/pdb.prot081059.
16. Ukrainets I. V., Gorokhova O. V., Nidal Amin Jaradat, Petrushova L. A., Mospanova E. V., Savchenkova L. V., Kuz'min V. E., Lyahovsky A. V. 4-Hydroxyquinolin-2-ones and their Close Structural Analogues as a New Source of Highly Effective Pain-killers. In book: Pain and Treatment, Racz G.B. and Noe C.E. (Ed.), Rijeka: InTech, 2014, pp.21-73. DOI: 10.5772/57402.
17. Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P., Sim G. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2014, Vol. 50, No.1, pp.103-110. doi:10.1007/s10593-014-1452-0.
18. Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P., Liu Yangyang. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2014, Vol. 50, No.4, pp.564-572. DOI:10.1007/s10593-014-1508-1.
19. Ukrainets I. V., Alexeeva T. V., Davidenko A. A., Grinenko V. V. Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2015, Vol. 13, No.3(51), pp.9-14.
20. Ukrainets I. V., Tugaibe I. A., Bereznyakova N. L., Kravchenko V. N., Turov A. V. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2008, Vol. 44, No.5, pp.565-575. DOI: 10.1007/s10593-008-0076-7.
21. Potapov V. M. Stereokhimiya (Stereochemistry). Moscow, Khimiya, 1988, 464 p.
22. Günther H. NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry. Weinheim, Wiley-VCH, 2013, 734 p.
23. Ukrainets I. V., Taran S. G., Likhonova N. V., Rybakov V. B., Gorokhova O. V., Jaradat Nidal Amin. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2000, Vol. 36, No.1, pp.49-56. DOI: 10.1007/BF02256844.
24. Vogel H. G. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Berlin, Springer; 2008, pp.1030-1032.
25. Sigidin Ya. A., Shvarts G. Ya., Arzamastsev A. P., Liberman S. S. Lekarstvennaya terapiya vospalitel'nogo protsessa (Drug Therapy of the Anti-inflammatory Process). Moscow, Meditsina; 1988, pp.60-63.
26. Sernov L. N., Gatsura V. V. Elementy experimentalnoi farmakologii (Elements of Experimental Pharmacology). Moscow, Nauka, 2000, pp.308-316.

Надійшла до редакції 07.09.2015 р.

A CONVENIENT WAY OF 3-FLUORO-1,8-NAPHTHALIMIDE SYNTHESIS

N.F.Fed'ko, V.F.Anikin

Odessa I.I.Mechnikov National University
2, Dvoryanskaya Str., Odessa, 65026. E-mail: fedko@onu.edu.ua

Key words: 3-fluoro-1,8-naphthalic anhydride; 3-fluoro-1,8-naphthalimide; acenaphthene; Balz–Schiemann reaction

The syntheses of 3-fluoro-1,8-naphthalimide and 3-fluoro-1,8-naphthalic anhydride from 3-nitro-1,8-naphthalimide have been described. 3-Nitro-1,8-naphthalimide can be obtained by nitration of naphthalimide with sodium nitrate in sulfuric acid. Stability of naphthalimides under acidic and alkaline conditions makes 3-substituted naphthalimides more suitable synthones for further functionalization compared to the corresponding 3-substituted naphthalic anhydrides. The best yield of 3-fluoro-1,8-naphthalimide was achieved through the following sequence: 1) nitration of naphthalic anhydride to 3-nitronaphthalic anhydride by sodium nitrate in the concentrated sulfuric acid; 2) ammonolysis of 3-nitronaphthalic anhydride to 3-nitronaphthalimide with aqueous ammonia; 3) reduction of 3-nitronaphthalimide to 3-amino-naphthalimide with sodium dithionite solution in aqueous ethanol; 4) preparation of 3-fluoronaphthalimide by diazotization of 3-aminonaphthalimide and subsequent thermal decomposition of the corresponding tetrafluoroborate. Nitration of naphthalic anhydride makes it possible to avoid the problem of poor solubility of naphthalimide in sulfuric acid. Subsequent reactions are conveniently carried out with naphthalimide derivatives, thus avoiding the difficulties encountered in isolating of 3-aminonaphthalic anhydride that can undergo a polymerization reaction. The new protocol is more efficient than the preparation route previously described leading to 3-substituted naphthalic anhydrides and naphthalimides by virtue of the substitution reaction at C-4 of acenaphthene followed by oxidation.

ЗРУЧНИЙ ШЛЯХ СИНТЕЗУ ІМІДУ 3-ФТОРО-1,8-НАФТАЛІНДИКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

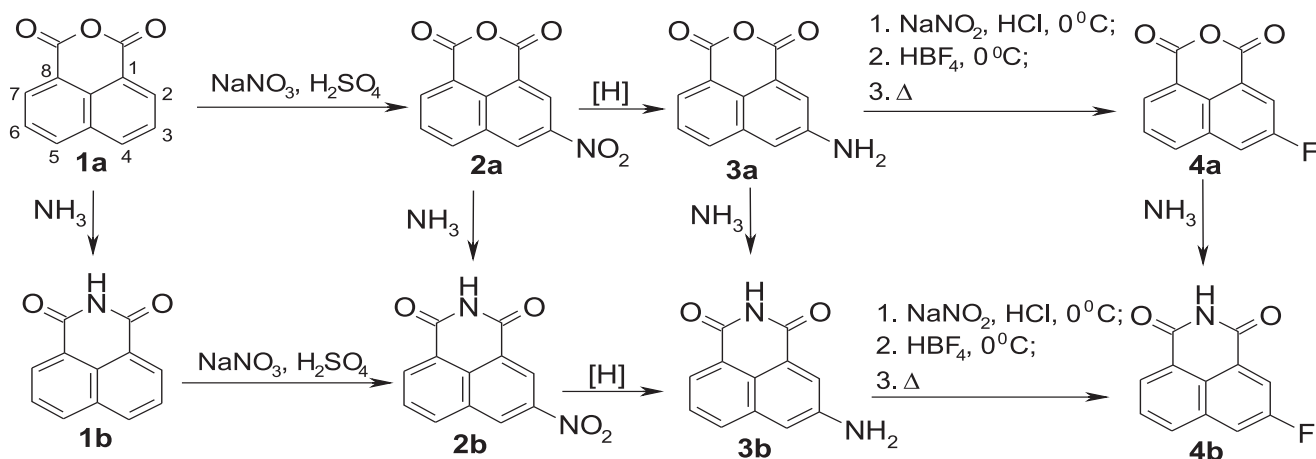
Н.Ф.Федько, В.Ф.Анікін

Ключові слова: 3-фторонафталімід; 3-фторонафталевий ангідрид; аценафтен; реакція Шимана
Отримано ангідрид та імід 3-фторо-1,8-нафталіндикарбонОВОЇ кислоти з використанням як вихідних сполук нафталевого ангідриду та нафталіміду. Показано, що 3-нітронафталімід може бути отриманий нітруванням нафталіміду нітратом натрію в сульфатній кислоті. Стійкість імідного циклу до дії кислот і лугів робить 3-заміщені іміді більш цінними вихідними сполуками при подальшій їх функціоналізації в порівнянні з відповідними 3-заміщеними нафталевиими ангідридами. Встановлено, що найкращим шляхом синтезу 3-фторонафталіміду, який приводить до максимального виходу цільового продукту, є наступна послідовність: 1) нітрування нафталевого ангідриду до 3-нітронафталіміду нітратом натрію в концентрованої сульфатній кислоті; 2) амоноліз 3-нітронафталевого ангідриду до 3-нітронафталіміду водним розчином амоніаку; 3) відновлення 3-нітронафталіміду до 3-амінонафталіміду дитіонітом натрію в водно-спиртовому середовищі; 4) отримання 3-фторонафталіміду з 3-амінонафталіміду через тетрафтороборат відповідної солі діазонію і далі термічним розкладанням останньої. Нітруванням нафталевого ангідриду вдається уникнути проблеми низької розчинності нафталіміду в сульфатній кислоті. Наступні реакції зручніше проводити з нафталімідним ядром, уникаючи таким чином труднощів, які виникають при виділенні 3-амінонафталевого ангідриду, здатного до гомоконденсації. Запропонований шлях є більш вигідним в порівнянні з відомим шляхом отримання 3-заміщених нафталевих ангідридів та нафталімідів введенням замісника в положення 4 аценафтену та подальшого окиснення.

УДОБНЫЙ ПУТЬ СИНТЕЗА ИМИДА 3-ФТОРО-1,8-НАФТАЛИНДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Н.Ф.Федько, В.Ф.Аникін

Ключевые слова: 3-фторонафталимид; 3-фторонафталевоый ангидрид; аценафтен; реакция Шимана
Синтезированы ангидрид и имид 3-фторо-1,8-нафталиндикарбонОВОЙ кислоты с использованием в качестве исходных веществ нафталевого ангидрида и нафталимида. Показано, что 3-нитронафталимид может быть получен нитрованием нафталимида нитратом натрия в серной кислоте. Устойчивость имидного кольца к действию кислот и щелочей делает 3-замещенные имиды более ценными исходными веществами при дальнейшей их функционализации по сравнению с соответствующими 3-замещенными нафталевыми ангидридами. Установлено, что наилучшим путем синтеза 3-фторонафталимида, приводящим к максимальному выходу целевого продукта, является следующая последовательность: 1) нитрование нафталевого ангидрида до 3-нитронафталимида нитратом натрия в концентрированной серной кислоте; 2) аммонолиз 3-нитронафталевого ангидрида до 3-нитронафталимида водным раствором аммиака; 3) восстановление 3-нитронафталимида до 3-аминонафталимида дитионитом натрия в водно-спиртовой среде; 4) получение 3-фторонафталимида из 3-аминонафталимида через тетрафтороборат соответствующей соли диазония и далее термическим разложением последней. Нитрованием нафталевого ангидрида удается избежать проблемы плохого растворения нафталимида в серной кислоте. Последующие реакции удобнее проводить с нафталимидным ядром, избежав таким образом трудностей, возникающих при выделении 3-аминонафталевого ангидрида, способного к гомоконденсации. Предложенный путь более выгоден по сравнению с известным путём получения 3-замещенных нафталевого ангидридов и нафталимидов введением заместителя в положение 4 аценафтена и дальнейшим окислением.



Scheme

Many derivatives of naphthalene-1,8-dicarboxylic acid imide are used as efficient fluorophores and biologically active substances. It is well known that some 3-substituted 1,8-naphthalimides possess a significant biological activity. Due to the high cytotoxic activity against various tumour cells and viruses, a number of these compounds are used as anticancer and antiviral agents [1-5].

Apparently, there are two ways to obtain 3-substituted 1,8-naphthalic anhydrides either by oxidation of the corresponding 4-substituted acenaphthene derivatives or by direct introduction of the substituent in position 3 of 1,8-naphthalic anhydride. The subsequent ammonolysis in both cases leads to the target 3-substituted 1,8-naphthalimides.

Surprisingly, there are no reports on the synthesis of 3-substituted naphthalimides from naphthalimide **1b** as the starting material though the imide and anhydride groups have the same labilizing effect on the substituents of the naphthalene ring. Yet, importantly, the robustness of naphthalimides under acidic and alkaline conditions makes 3-substituted imides more suitable synthones for further functionalization.

3-Fluoro-, 4-fluoro- and 5-fluoroacenaphthenes were obtained by Yagupolskii & Ivanova [6]. 4-Fluoroacenaphthene, the least accessible of three isomers, could be envisioned as the starting material for preparation of the unknown 3-fluoro-1,8-naphthalic anhydride and the corresponding imide. Therefore, the aim of the present work was to synthesize 3-fluoro-1,8-naphthalimide from readily available 1,8-naphthalic anhydride **1a** and 1,8-naphthalimide **1b**.

The conceivable way of 3-fluoro-1,8-naphthalimide **4a** preparation consists of the following steps: 1) nitration of 1,8-naphthalic anhydride **1a**; 2) reduction of 3-nitro-1,8-naphthalic anhydride **2a**; 3) fluorination by the Balz-Schiemann reaction; 4) ammonolysis of 3-fluoro-1,8-naphthalic anhydride.

Alternatively, anhydrides **1a**, **2a**, **3a** can be converted into the corresponding imides **1b**, **2b**, **3b** via

the ammonolysis reaction, and subsequent transformations towards **4b** can be carried out with imides as follows from the scheme below (Scheme).

The nitration of 1,8-naphthalic anhydride and 1,8-naphthalimide was carried out by sodium nitrate in the concentrated sulfuric acid at elevated temperature. It was detected that naphthalimide (**1b**) had lower solubility in sulfuric acid comparing with naphthalic anhydride (**1a**). The yield of anhydride **2a** was 78%, the yield of imide **2b** – 70%. 3-Nitro-1,8-naphthalimide **2b** was also obtained by ammonolysis of 3-nitro-1,8-naphthalic anhydride **2a** with 93% yield.

3-Amino-1,8-naphthalic anhydride **3a** (as hydrochloride) and 3-amino-1,8-naphthalimide **3b** were prepared by reduction of 3-nitro-1,8-naphthalic anhydride (**2a**) and 3-nitro-1,8-naphthalimide (**2b**) with sodium dithionite solution in aqueous ethanol. The reaction yielded 64% and 71% of anhydride and imide **3a** and **3b**, respectively.

Since amino anhydride **3a** is a bifunctional compound that can undergo the polymerization reaction, it needs to be converted into more stable hydrochloride. In contrast, the polymerization for 3-aminonaphthalimide is not a problem as transamination does not occur easily because of the lower reactivity of the imide carbonyl group in A_N reactions. 3-Amino-1,8-naphthalimide **3b** was also obtained by ammonolysis of 3-amino-1,8-naphthalic anhydride (**3a**) with 89% yield.

3-Fluoro-1,8-naphthalic anhydride **4a** and 3-fluoro-1,8-naphthalimide **4b** were synthesized with 19% and 24% yield, respectively, by diazotization of 3-amino-1,8-naphthalic anhydride and 3-amino-1,8-naphthalimide and subsequent thermal decomposition of the corresponding tetrafluoroborates. 3-Fluoronaphthalimide **4b** was also obtained by ammonolysis of 3-fluoronaphthalic anhydride **4a** with the yield of 90%.

3-Fluoro-1,8-naphthalic anhydride and 3-fluoro-1,8-naphthalimide are light yellow crystalline substances with melting points of 221-222°C and 305-307°C, respectively.

The structure of 3-fluoronaphthalic anhydride and 3-fluoronaphthalimide was determined by IR and ^1H NMR spectroscopy.

The IR spectrum of anhydride **4a** exhibits intense absorption bands at 1780 cm^{-1} and 1734 cm^{-1} corresponding to the stretching vibrations of carbonyl groups of the anhydride moiety. In the IR spectrum of imide **4b** two absorption bands at 1698 cm^{-1} and 1674 cm^{-1} are observed corresponding to the characteristic stretching vibrations of the imide carbonyl groups. The presence of the N-H bond in 3-fluoronaphthalimide is confirmed by absorption at 3170 cm^{-1} . The absorption band at $1095\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ in the IR spectra of anhydride **4a** and imide **4b** corresponds to the stretching vibrations of the C-F bond.

In the ^1H NMR spectra of compounds **4a** and **4b** the signals of aromatic protons resonate up-field in the range of 8.0–8.7 ppm. The signals from H^2 and H^4 protons are split by ^{19}F nucleus into doublets with the coupling constant $J_{\text{H-F}} = 12.4\text{ Hz}$. The signal of proton H^6 is observed as a doublet of doublets due to coupling with the magnetically inequivalent H^5 and H^7 protons, which give rise to doublets. The signal of the imide proton in compound **4b** appears as a singlet at 11.62 ppm ($\text{d}_6\text{-DMSO}$).

According to our results the best synthetic route to 3-fluoro-1,8-naphthalimide is as follows: 1,8-naphthalic anhydride (**1a**) \rightarrow 3-nitro-1,8-naphthalic anhydride (**2a**) \rightarrow 3-nitro-1,8-naphthalimide (**2b**) \rightarrow 3-amino-1,8-naphthalimide (**3b**) \rightarrow 3-fluoro-1,8-naphthalimide (**4b**).

Experimental Part

The ^1H NMR spectra were recorded at ambient temperature on a BRUKER WM 400 spectrometer with an operating frequency of 400 MHz, in DMSO-d_6 as a solvent and TMS as the internal standard. The IR spectra (in KBr) were recorded on a Perkin Elmer Frontier FT-IR spectrometer. The reaction course and purity of the compounds synthesized were monitored by thin layer chromatography on Silicagel 60 F254 plates (Merck) with chloroform as an eluent, followed by exposure to UV light. 1,8-Naphthalic anhydride and 1,8-naphthalimide were prepared from acenaphthene according to the known procedure [7].

3-Nitro-1,8-naphthalic anhydride (5-nitrobenzo[de]isochromene-1,3-dione) (2a). Add sodium nitrate (1.30 g, 15 mmol) portion wise to the solution of 1,8-naphthalic anhydride (3.00 g, 15 mmol) in 30 ml of the concentrated sulfuric acid. Heat the reaction mixture for 2 h on a water bath, then pour onto ice, filter the precipitate, wash with water and dry at 110°C . Purify the crude product by crystallization from acetic acid to obtain 3-nitronaphthalic anhydride as a yellow solid (2.85 g, 78%). M.p. – $242\text{--}244^\circ\text{C}$ [7].

3-Nitro-1,8-naphthalimide (5-nitro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione) (2b). Compound **2b** was

prepared analogously to compound **2a** using naphthalimide (2.00 g) in 50 ml of concentrated sulfuric acid and sodium nitrate (1.30 g). Crystallization from acetic acid yields title compound (1.70 g, 70%) as a yellow solid. M.p. – $311\text{--}312^\circ\text{C}$ [7].

3-Amino-1,8-naphthalic anhydride (5-aminobenzo[de]isochromene-1,3-dione) (3a). Dissolve 3-nitro-1,8-naphthalic anhydride (1.00 g, 4 mmol) in ethanol (100 ml) and hot water (50 ml). Add sodium dithionite (0.55 g) portion wise while stirring. Reflux the reaction mixture for 3 h and concentrate on a water bath. Add hydrochloric acid (10 ml) to the residue, filter the precipitate and dry to obtain 3-amino-1,8-naphthalic anhydride hydrochloride (0.65 g, 64%) as an orange solid. M.p. – $290\text{--}292^\circ\text{C}$ [7].

3-Amino-1,8-naphthalimide (5-amino-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione) (3b). Compound **3b** was prepared analogously to compound **3a** using 3-nitronaphthalimide (1 g, 4 mmol) in ethanol (100 ml)/hot water (50 ml) and sodium dithionite (0.55 g). The title compound (0.7x g, 71%) was obtained as an orange solid. M.p. – $333\text{--}335^\circ\text{C}$ [7].

3-Fluoro-1,8-naphthalic anhydride (5-aminobenzo[de]isochromene-1,3-dione) (4a). Heat 3-amino-1,8-naphthalic anhydride (0.5 g, 2 mmol) and hydrochloric acid (2 ml) in 10 ml of water to reflux, then cool the mixture to 0°C . Add the solution of sodium nitrite (0.14 g, 0.002 mol) in 10 ml of water dropwise at 0°C while stirring vigorously. Stir the reaction mixture for 30 min at 0°C and filter under ice cooling. Cool the filtrate to -5°C , add tetrafluoroboric acid (2 ml) to the filtrate, leave the reaction mixture at -5°C for 30 min, filter the precipitate and wash with cold methanol. Dry the resulting diazonium tetrafluoroborate salt over sulfuric acid. The diazonium salt was thermally decomposed, the residue in the distillation flask was crystallized from acetic acid. 3-Fluoro-1,8-naphthalic anhydride (0.09 g, 19%) was obtained as pale yellow solid. M.p. – $221\text{--}222^\circ\text{C}$. IR (KBr, cm^{-1}): 852, 1016, 1095, 1228, 1300, 1338, 1504, 1564, 1590, 1734, 1780, 3030. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , δ , ppm, J , Hz): 8.62 d (1H), $J_{\text{H-F}} = 12.4$ (H^2); 8.69 d (1H), $J_{\text{H-F}} = 12.4$ (H^4); 8.09 d (1H), $J_{56} = 8.0$ (H^5); 8.06 dd (1H), $J_{56} = 8.0$, $J_{67} = 8.4$ (H^6); 8.47 d (1H), $J_{67} = 8.4$ (H^7). Found, %: C 66.72; H 2.31; F 8.75; O 22.17. $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{FO}_3$. Calculated, %: C 66.68; H 2.33; F 8.79; O 22.20.

3-Fluoro-1,8-naphthalimide (5-amino-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione) (4b). Compound **3b** was prepared analogously to compound **3a** using 3-aminonaphthalimide (0.50 g, 2 mmol) and sodium nitrite (0.10 g, 2 mmol). The title compound (0.10 g, 24%) was obtained as a pale yellow solid. M.p. – $305\text{--}307^\circ\text{C}$. IR (KBr, cm^{-1}): 850, 968, 1015, 1100, 1266, 1350, 1574, 1592, 1680, 1728, 3032, 3170. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , δ , ppm, J , Hz): 8.50 d (1H), $J_{\text{H-F}} = 8.8$ (H^2); 8.56 d (1H), $J_{\text{H-F}} = 8.8$ (H^4); 8.00 d (1H), $J_{56} = 8.0$ (H^5); 7.98 dd (1H), $J_{56} = 8.0$, $J_{67} = 8.4$ (H^6); 8.35 d (1H), J_{67}

= 8.4 (H⁷); 11.62 s (NH)). Found, %: C 67.04; H 2.76; F 8.75; N 6.50; O 14.82. C₁₂H₆FNO₂. Calculated, %: C 66.98; H 2.81; F 8.83; N 6.51; O 14.87.

Synthesis of 3-substituted 1,8-naphthalimides (2b-4b) by ammonolysis of naphthalic anhydrides (2a-4a). Heat the corresponding naphthalic anhydride (2 mmol) on a water bath in 20 ml of 16% aqueous ammonia for 3 h. Dilute the reaction mixture with 10 ml of water. Filter the precipitate, wash with water, and dry at 110°C. Purify the crude product by crystallization from acetic acid to obtain the corresponding naph-

thalimide (1.7-1.9 mmol) with the identical melting points as of the samples above.

Conclusions

1. It has been shown that 3-nitronaphthalimide can be obtained by direct nitration of naphthalimide with a high yield.

2. 3-Fluoronaphthalimide can be synthesized with an optimal yield by the following sequence: naphthalic anhydride → 3-nitronaphthalic anhydride → 3-nitronaphthalimide → 3-fluoronaphthalimide.

References

1. Negwer M., Scharnow H.-G. *Organic-chemical drugs and their synonyms. The 8th edition.* Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 4228 p.
2. Hayes B. A., Gupta S., Chang S. C. J. *Labelled Compd. Radiopharm.*, 1996, Vol. 38, No.7, pp.607-612.
3. Eglen R. M., Bonhaus D. W., Clark R. D. *Neuropharmacology*, 1994, Vol. 33, No.3/4, pp.515-526.
4. Xie L., Xu Y., Wang F. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, Vol. 17, No.2, pp.804-810.
5. Tan S., Yin H., Chen Z. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, Vol. 62, No.4, pp.130-138.
6. Yagupolskii L. M., Ivanova Zh. M. *Zh. Obshch. Khim.*, 1957, Vol. 27, No.8, pp.2273-2276.
7. Dashevsky M. M. *Acenaphthene. M.:Khimiya*, 1966, 460 p.

Надійшла до редакції 29.07.2015 р.

TESTING OF A NEW DOCKING SCORING FUNCTION ON THE EXAMPLE OF INHIBITORS OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1B

V.Yu.Tanchuk, V.O.Tanin

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry National Academy of Sciences of Ukraine
1, Murmans'ka Str., Kyiv, 02660. E-mail: v_tanchuk@yahoo.com, vtaninva@gmail.com

Key words: protein tyrosine phosphatase 1B; PTP1B; inhibition; molecular docking

A new scoring function H1 recently developed for molecular docking has been tested on the complexes of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) from the PDB data bank and using docking of a set of inhibitors from the NIH database. The function is based on the scoring functions of AutoDock and AutoDock Vina and is implemented in the modified version of the AutoDock. The function performed well both in the case of the complexes from the PDB databank and in a real docking process. Calculation of pKi for the complexes from the PDB databank was very accurate. The molecular docking has been done with a modified version of AutoDock that uses spatial constraints and a new search engine. Energies of complexes were minimized, and pKi values of the resulting complexes were estimated by the new scoring function. As shown previously, conformations of PTP1B in complexes with ligands can be divided into five clusters. All five typical conformations of PTP1B binding pocket were used for docking. Better docking results were obtained on the clusters with open WPD loop though some compounds could not be docked well to such conformations of the enzyme. The function has shown a good "scoring power" (i. e. the ability to predict pKi values) and "screening power" (the ability to enrich top 10 or 20% of predictions by real active compounds) thus proving to be suitable for the virtual screening of potential PTP1B inhibitors. The performance of the new scoring function H1 was much better than that of the original scoring function of AutoDock tested earlier.

ТЕСТУВАННЯ НОВОЇ ОЦІНОЧНОЇ ФУНКЦІЇ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ НА ПРИКЛАДІ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНОТИРОЗИНФОСФАТАЗИ 1В

В.Ю.Танчук, В.О.Танін

Ключові слова: протеїнотирозинфосфатаза 1В; PTP1B; інгібітори; молекулярний докінг

Нова нещодавно розроблена оціночна функція H1 для молекулярного докінгу тестувалася на комплексах протеїнотирозинфосфатази 1В (PTP1B) з банку даних PDB і за допомогою докінгу набору інгібіторів з бази даних NIH. Функція базується на оціночних функціях AutoDock і AutoDock Vina і реалізована в модифікованій версії AutoDock. Функція показала себе добре як у випадку комплексів з банку даних PDB, так і в реальному докінгу. Розрахунок pKi для комплексів з банку даних PDB виявився дуже точним. Молекулярний докінг проводився модифікованою версією AutoDock, яка використовує просторові обмеження і новий спосіб пошуку. Енергії комплексів мінімізувались, і pKi для отриманих комплексів оцінювались за допомогою нової функції H1. Як було показано раніше, конформації PTP1B в комплексах з лігандами поділяються на п'ять груп. Всі п'ять типових конформацій зв'язувальної кишені PTP1B були використані для докінгу. Найкращі результати отримані при докінгу на кластерах з відкритою петлею WPD, хоча деякі сполуки не здатні утворювати достатньо добрі комплекси з ферментом у таких конформаціях. Функція показала високий «оціночний потенціал» (тобто здатність прогнозувати значення pKi) і «скринінговий потенціал» (здатність збагачувати верхні 10 або 20% від прогнозування реально активними сполуками). Таким чином, оціночна функція H1 виявилась придатною для віртуального скринінгу потенційних інгібіторів PTP1B. Результати нової оціночної функції H1 були набагато кращими, ніж у вихідної оціночної функції AutoDock, яка була випробувана раніше.

ТЕСТИРОВАНИЕ НОВОЙ ОЦЕНОЧНОЙ ФУНКЦИИ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА НА ПРИМЕРЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗЫ 1В

В.Ю.Танчук, В.А.Танин

Ключевые слова: протеинтирозинфосфатаза 1В; PTP1B; ингибиторы; молекулярный докинг

Новая недавно разработанная оценочная функция H1 для молекулярного докинга была протестирована на комплексах протеинтирозинфосфатазы 1В (PTP1B) из банка данных PDB и при помощи докинга набора ингибиторов из базы данных NIH. Функция основана на оценочных функциях AutoDock и AutoDock Vina и реализована в модифицированной версии AutoDock. Функция показала себя хорошо как в случае комплексов из банка данных PDB, так и в реальном процессе докинга. Расчет значений pKi для комплексов из банка данных PDB был очень точным. Молекулярный докинг проводился модифицированной версией AutoDock, которая использует пространственные ограничения и новый способ поиска. Энергии комплексов минимизировались, и pKi для полученных комплексов оценивались с помощью новой функции H1. Как было показано ранее, конформации PTP1B в комплексах с лигандами можно разделить на пять групп. Все пять типичных конформаций связывающего кармана PTP1B использовались для докинга. Лучшие результаты получены при докинге на кластерах с открытой WPD-петлей, хотя некоторые соединения не могут образовывать достаточно хорошие комплексы с такими конформациями фермента. Функция показала высокий «оценочный потенциал» (т. е. способность предсказывать значения pKi) и «скрининговый потенциал» (способность обогащать верхние 10 или 20% от предсказаний реально активными соединениями). Таким образом, оценочная функция H1 подходит для виртуального скрининга потенциальных ингибиторов PTP1B. Результаты новой оценочной функции H1 были намного лучше, чем у исходной оценочной функции AutoDock, которая испытывалась ранее.

Multiple biochemical processes, which depend on dephosphorylation of phosphotyrosine residues in proteins, are regulated by protein tyrosine phosphatases, including cell-signaling and metabolism pathways [1-3]. Being known to be involved in insulin receptor dephosphorylation, the intracellular protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is considered to be a negative regulator of insulin signal transduction [4]. For potential treatment of type 2 diabetes and obesity PTP1B is considered to be one of the most promising therapeutic targets [5]. The development of potent and selective inhibitors of this enzyme engages constantly growing interest. Derivatives of carboxylic, phosphonic, sulfonic acids, heterocyclic and other compounds have been tested as PTP1B inhibitors [6].

Computer simulations are known to play a considerable role in drug design studies, and such methods have been already applied in the case of PTP1B. Specified active compounds have been studied using computer-based approaches, including molecular docking [7, 8], an important tool used to understand a detailed mechanisms of the inhibitor binding to an enzyme. PTP1B is one or rare cases when the enzyme is represented by a large amount of data in the PDB data bank [9]. This is another evidence of the significance of the enzyme, but it is also an issue for the investigator. Computer simulations usually rely on multi-dimensional optimization, which makes them heavily dependent on starting conditions since the energy surfaces are very complicated with a great number of local minima. We have already studied conformations of PTP1B and found that they can be divided into 5 clusters. Each cluster is a group of similar PTP1b conformations in protein-ligand complexes representing a typical way of ligand binding [10]. A cluster centroid is the most typical representative of the cluster that may be used for computer simulations as a representative of its binding type. Conformations of two clusters have the so-called WPD-loop (an important moving part of the enzyme at the entrance to the catalytic centre with WPD (Tryptophan-Proline-Aspartic acid) sequence in the middle) in an open position and three other ones in a closed position. The WPD-loop plays an important role in the enzyme functioning. It interacts with a substrate during the catalysis of dephosphorylation. There are many inhibitors that bind to the enzyme with the open or closed WPD-loop. Using centroids of all clusters we have already performed molecular docking with a modified version of the AutoDock [11]. Unfortunately, we have not found the cluster providing the best docking results. We have not also

found the dependence between the chemical structure and the kind of the cluster that gives the best result for the compound. Despite that there were dockings that gave results very close to the experimental ones.

The authors have recently developed a new scoring function for molecular docking [12]. The function is based on the scoring functions of the well-known docking packages AutoDock [13] and AutoDock Vina [14]. The scoring functions used are very different in nature, but share the same input and output format making their combination practical. A new scoring function H1 includes all terms of both scoring functions. New weights for them are fitted by MLRA (Multiple Regression Analysis). The training set of protein-ligand complexes was obtained from the refined set of PDBbind (www.pdbbind.org.cn, version 2012) [15] and included 2,412 complexes (some complexes were excluded because of their incompatible format). A test set consisted of 313 complexes that appeared in the 2013 edition of PDBbind¹. The new function H1 outperformed both old scoring functions on both sets.

The aim of the present work was to study the new scoring function on the example of PTP1B inhibitors. First of all, we tested H1 on the known complexes of PTP1B with inhibitors. The refined set of the PDBbind database included 26 complexes. The results are summarized in Table 1. The AutoDock Vina performs slightly better on PTP1B compared to the H1 function. This can be explained by the fact that 20 complexes were included in the core set of the PDBbind already in 2007 version and used to train the AutoDock Vina scoring function. As an additional validation, we have added 28 additional complexes from other sources, which we consider reliable enough to be used. The performance of our hybrid scoring function is much better for this test set and for a combined set of 54 complexes as well. It is also interesting to note that AutoDock performs better than AutoDock Vina, which is not usually the case.

The result of the H1 scoring function seems extraordinary taking into account that the experimental error of pK_i determination is about 0.6 [16]. Unfortunately, this is not sufficient. The results of docking depend much on both the accurate scoring function and the docking algorithms. The scoring function must be tested in real docking, and it should provide at least enrichment of results by active compounds.

That is why the new scoring function was tested in conditions similar to our previous work [11]. The same set of phosphorus containing inhibitors² from the NIH database [17] was docked to the same PDB structures representing five typical conformations

¹ The core set had 2,959 complexes in releases in 2013, and 2,897 complexes (2,412 of which were in the training set) in 2012. 313 new complexes have been added, and 251 complexes have been removed from the core set.

² Some of 208 compounds appeared to be redundant. The new set consists of 203 structures.

Table 1

Comparison of the prediction power of the scoring functions on the known complexes of PTP1B with the inhibitors where R is the non-parametric Pearson correlation coefficient, RMSE is the root mean square error, and MAE is the mean absolute error

Scoring Function	PDBBind*, 26 complexes			Additional Set**, 28 complexes			Both Sets, 54 complexes		
	R	RMSE	MAE	R	RMSE	MAE	R	RMSE	MAE
H1	0.45	1.15	1.0	0.47	1.09	0.84	0.50	1.12	0.91
AutoDock Vina	0.39	1.16	0.92	0.15	2.58	2.25	0.05	2.03	1.61
AutoDock	0.23	2.89	2.58	0.39	1.83	1.38	0.21	2.41	1.96

* – 26 structures of PTP1B derived from PDBbind (refined set); ** – 28 structures of PTP1B outside of PDBbind (test set).

Table 2

Comparison of the docking results

Parameter	Scoring Function	Cluster centroids				
		open WPD loop		closed WPD loop		
		1NL9	1PH0	1Q6M	2CM8	2CNF
R	AutoDock	0.15	0.29	0.23	0.24	0.17
	H1	0.58	0.53	0.56	0.41	0.49
RMSE	AutoDock	1.92	1.99	2.79	2.03	1.97
	H1	1.59	1.56	2.05	1.91	1.80

of PTP1B [11]. It is assumed that the inhibitors with phosphonic groups are competitive inhibitors and bind near the catalytic Cys215. Docking was performed by a modified version of AutoDock using a new search algorithm [18]. Positions of the atoms of phosphorus were limited to the region around the position of phosphorus (or sometimes sulfur) in the

original PDB files of the cluster centroids. There is also a substantial difference. The previous versions of AutoDock use the same function for docking and scoring. In this version docking is performed by minimizing the energy of the ligand-enzyme complex, and the scoring function is calculated later (the post-processing stage). This was done because there were

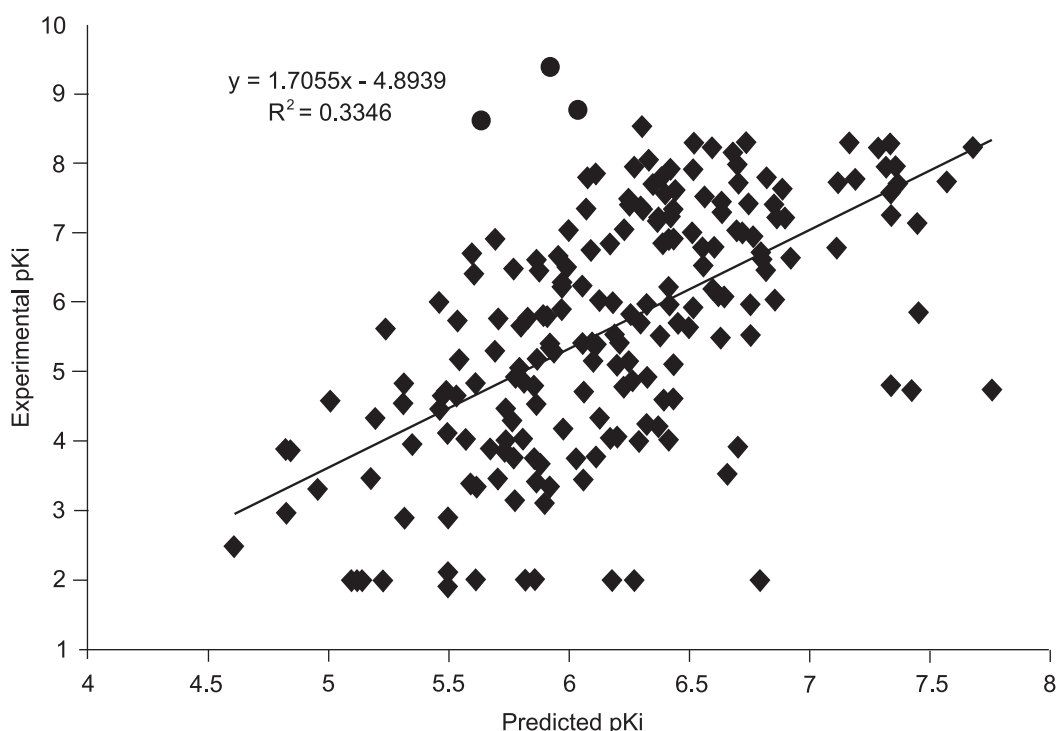


Fig. The docking results for phosphorus-containing inhibitors in the active site of PTP1B (PDB code 1NL9). Round dots depict outliers which can not be predicted well with the open WPD loop. The closed loop gives better results for them.

some doubts about the suitability of H1 for docking. There were also some technical difficulties. Nevertheless, such combination of docking (energy minimization by more or less standard force field) and scoring (estimation of the complex by the new scoring function H1) proved to be workable.

As it follows from Table 2, the new scoring function and the new docking scheme provide a substantial improvement. There is practically no correlation between the predicted and calculated binding constants [11]. Now the correlation is much better. The values of Pearson's correlation coefficient (R) being of 0.5-0.6 are not bad for docking. For example, the authors [19] compared more than 20 scoring functions from different sources and their best function gave R of 0.61 and RMSE of 1.78 for the test set of 195 complexes. This is very similar to our results. They called this testing of ability to predict pK_i value a "scoring power" test.

The clusters with the open WPD look seem to be preferable for docking phosphorus-containing inhibitors. Correlation coefficients are higher and errors are lower by using such clusters. Nevertheless, it is hard to obtain good results for all ligands using only one cluster (see Fig.).

In addition to the "scoring power" test, we decided to test the "screening power". In this case we selected top 10% (21) and top 20% (42) predictions for each cluster and checked how many true activities (experimental $pK_i > 6.0$) are among these ligands (Table 3).

As it can be seen from Table 3, the function H1 provides much better enrichment on all clusters. Besides, the results are almost identical for all the clusters (used, studied). Only 1NL9, being the best at

References

1. Tonks N. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2006, Vol. 7, No.11, pp.833-846.
2. Vintonyak V., Antonchick A., Rauh D., Waldmann H. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, Vol. 13, No.3, pp.13272-13283.
3. Taberero L., Aricescu A., Jones E., Szedlacsek S. *FEBS J.*, 2008, Vol. 275, No.5, pp.867-882.
4. Kasibhatla B., Wos J., Peters K. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 2007, Vol. 8, No.10, pp.805-813.
5. Koren S., Fantus I. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007, Vol. 21, No.4, pp.621-640.
6. Tanchuk V. Yu., Tanin V. O., Vovk A. I. *ЖОФХ*, 2013, Т. 11, вун. 2, No.42, pp.51-56.
7. Hu X., Vujanac M., Stebbins C. J. *Mol. Graph. Model.*, 2004, Vol. 23, No.2, pp.175-187.
8. Hu X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, Vol. 16, No.24, pp.6321-6327.
9. Bernstein F., Koetzle T., Williams G., Meyer E., Brice E., Rodgers M., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. *J. Mol. Biol.*, 1977, Vol. 112, No.2, pp.535-542.
10. Tanchuk V., Tanin V., Vovk A. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, Vol. 80, No.1, pp.121-128.
11. Tanin V., Tanchuk V. *Proceedings of the National Aviation University*, 2014, No.3, pp.87-92.
12. Tanchuk V., Tanin V., Vovk A., Poda G. *Current Drug Discov. Technol.*, 2015, Vol. 12, No.3, pp.170-178.
13. Morris G., Huey R., Lindstrom W. et al. *J. Comput. Chem.*, 2009, Vol. 30, No.16, pp.2785-2791.
14. Trott O., Olson A. J. *J. Comput. Chem.*, 2010, Vol. 31, No.2, pp.455-461.
15. Wang R., Fang X., Lu Y., Wang S. *J. Med. Chem.*, 2004, Vol. 47, No.12, pp.2977-2980.
16. Wang L., Wu Y., Deng Y., Kim B., Pierce L., Krilov G. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, Vol. 137, No.7, pp.2695-703.
17. Liu T., Lin Y., Wen X., Jorrissen R., Gilson M. *Nucleic Acids Res.*, 2007, Vol. 35, Database issue, pp.D198-D201.
18. Tanchuk V., Tanin V., Vovk A. III Intern. Conf. "High Performance Computing" HPC-UA 2013, Ukraine, Kyiv, 2013, pp.399-401, <http://hpc-ua.org/hpc-ua-13/files/proceedings/76.pdf>
19. Li Y., Li J., Han L., Liu J., Zhao Z., Wang R. *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, Vol. 54, No.6, pp.1717-1736.

Надійшла до редакції 09.10.2015 р.

Abbreviations: PTP1B – protein tyrosine phosphatase 1B; RMSE – root mean square error; MAE – mean average error; pK_i – $-\log_{10}(K_i)$ where K_i is the inhibition constant.

Table 3

Comparison of the "screening power" of the scoring functions. There were 91 true active compounds among 203 ligands

Cluster centroid (PDB code)	Top 10%, 21 ligands		Top 20%, 42 ligands	
	function		function	
	Old	H1	Old	H1
1NL9	10	17	17	32
1PH0	7	18	16	36
1Q6M	12	18	29	36
2CM8	15	18	29	35
2CNF	14	18	27	36

"scoring power", is the worst one here. 1PH0, another cluster with the open WPD-loop, seems to be the best in the both tests (good correlation, $R = 0.53$, the smallest RMSE = 1.56). Though the old AutoDock's function is far from ideal, it gives better results for the clusters with the open WPD-loop.

Conclusions

The new scoring function for molecular docking and the new docking algorithm of the modified AutoDock have been tested on the complexes of PTP1B with inhibitors. The new approach has shown much better results than our previous attempts. The scoring function H1 and the new docking approach based on the modified search engine and optimization of the energy of the enzyme-ligand complex have proven to be suitable for the virtual screening of potential PTP1B inhibitors.

UDC 54.057:547.831:547.29'05

SYNTHESIS AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 3-(2-METHYL-4-OXO-1,4-DIHYDROQUINOLINE-3-YL)PROPANOIC ACIDS

V.O.Zubkov¹, T.P.Osolodchenko², N.I.Ruschak³, O.L.Kamenetska¹, O.V.Kiz¹¹ National University of Pharmacy

53, Pushkinska Str., Kharkov, 61002, Ukraine. E-mail: vadim.zubkov@nuph.edu.ua

² Institute Microbiology and Immunology named after I.I.Mechnikov NAMS of Ukraine³ Ivano-Frankivsk National Medical University

Key words: quinolone-4-one; 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid; structure-activity relationship; antimicrobial activity

In order to reveal the possible regularities of the structure–activity relationship the derivatives of 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid having various substituents in α -position of the acidic moiety of propanoic acid such as alkyl, carboxyl, acyl and acetamide substituents have been synthesized. The synthesis of the target compounds has been carried out using 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one as a versatile alkylating reagent. Its interaction with methylene active substances allowed to obtain monoalkyldicarbonyl compounds, which further hydrolysis gave the derivatives of 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid. The structures of the compounds obtained have been confirmed by the data of ¹H NMR and elemental analysis. The results of the screening performed by the agar diffusion method have shown different levels of the antimicrobial activity. For two compounds – 1,3-diethoxy-2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]-1,3-dioxopropan-2-yl-carbamic acid and 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid a moderate broad-spectrum activity has been found in the screening method. The results of the research have shown the perspectiveness of further search for novel antibacterial agents based on 4-quinolon-3-yl-propanoic acids, therefore, it is necessary to expand the range of the compounds with this scaffold.

СИНТЕЗ ТА АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ 3-(2-МЕТИЛ-4-ОКСО-1,4-ДИГІДРОХІНОЛІН-3-ІЛ)ПРОПАНОВИХ КИСЛОТ

В.О.Зубков, Т.П.Осолодченко, Н.І.Рушак, О.Л.Каменецька, О.В.Кіз

Ключові слова: гідрохінолін-4-он; 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-іл)пропанова кислота; зв'язок структура – дія; антимікробна активність

З метою виявлення можливих закономірностей зв'язку структура – дія були синтезовані похідні 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-іл)пропанової кислоти з різними замісниками в α -положенні залишку пропанової кислоти – алкільними, карбоксильними, ацильними та ацетамідними. Синтез цільових сполук проводили з використанням 3-диметиламінометил-2-метил-1,4-дигідрохінолін-4-ону в якості зручного алкілюючого реагента. Його взаємодією з метиленактивними речовинами були одержані моноалкілдикарбонільні сполуки, подальший гідроліз яких приводив до похідних 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-іл)пропанової кислоти. Структури отриманих сполук були підтверджені на основі даних ¹H ЯМР та елементного аналізу. За результатами скринінгу, виконаного методом дифузії в агар, виявлені різні рівні антимікробної активності для досліджуваних речовин. Проте дві сполуки: 1,3-діетокси-2-[(2-метил-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-іл)метил]-1,3-діоксопропан-2-іл карбамінова кислота та 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-іл)пропанова кислота показали помірну активність широкого спектра дії. Проведені дослідження показали перспективність подальшого пошуку потенційних антибактеріальних агентів на основі 4-хінолон-3-іл-пропанової кислоти, для чого необхідно розширити діапазон сполук, що містять даний скаффолд.

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ 3-(2-МЕТИЛ-4-ОКСО-1,4-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-ИЛ)ПРОПАНОВЫХ КИСЛОТ

В.А.Зубков, Т.П.Осолодченко, Н.И.Рушак, О.Л.Каменецкая, О.В.Киз

Ключевые слова: хинолин-4-он; 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-ил)пропановая кислота; связь структура – действие; антимикробная активность

С целью выявления возможных закономерностей связи структура – действие были синтезированы производные 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-ил)пропановой кислоты с различными заместителями в α -положении остатка пропановой кислоты – алкильными, карбоксильными, ацильными и ацетамидными. Синтез целевых соединений был осуществлен с использованием 3-диметиламинометил-2-метил-1,4-дигидрохинолин-4-она в качестве удобного алкилирующего реагента. Его взаимодействие с метиленактивными веществами позволило получить моноалкилдикарбонильные соединения, последующий гидролиз которых давал производные 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-ил)пропановой кислоты. Структуры полученных соединений были подтверждены на основе данных ¹H ЯМР и элементного анализа. По результатам скрининга, выполненного методом диффузии в агар, выявлены различные уровни антимикробной активности для исследуемых веществ. Однако два соединения: 1,3-диэтокси-2-[(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-ил)метил]-1,3-диоксопропан-2-ил карбаминная кислота и 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-ил)пропановая кислота показали умеренную активность широкого спектра действия. Проведенные исследования показали перспективность дальнейшего поиска потенциальных антибактериальных агентов на основе 4-хинолон-3-ил-пропановой кислоты, для чего необходимо расширить диапазон соединений, содержащих данный скаффолд.

The discovery of antibiotics was one of the most significant events in the history of medicine which had led to significantly increase of the human life expectancy. Together with vaccination and public health measures, antibiotics have played an important role in the drastic reduction of the mortality rate from infectious diseases [1]. However, from the first application of penicillin in practical medicine, humanity was faced with the serious problem of the antimicrobial resistance (AMR) occurrence. In consequence, after using any new antibiotics for the first time cases of clinically significant resistance to these drugs developed by microorganisms in a relatively short period of time were identified (Fig. 1) [2].

In recent decades, the problem of AMR has rapidly escalated and became global. The number of registered cases of AMR increased in hundreds of times. In addition to the natural ability of microorganisms to acquire antibiotics resistance, anthropogenic factors such as the irrational and uncontrolled overuse of antibiotics in medicine and agriculture, as well as the absence of introduction of new drugs in the last 30 years have been added [3]. The World Health Organization (WHO) emphasizes that “the antimicrobial re-

sistance is no longer a prediction for the future; it is happening right now, across the world, and is putting at risk the ability to treat common infections in the community and hospitals. Without urgent, coordinated action, the world is heading towards a post-antibiotic era, in which common infections and minor injuries, which have been treatable for decades, can once again kill” [4]. Therefore, the research aimed at finding new antimicrobial agents is a priority task of modern medicinal chemistry.

Fluoroquinolones are broad-spectrum antibacterials based on the structure of nalidixic acid – the first active agent in this class of compounds [5]. The fluoroquinolone antibiotic class has evolved through four subsequent generations, each loosely defined by either structural modifications, ability to overcome resistant mutant bacteria, or the type of bacterial infection targeted [6, 7]. However, it should be noted that the bacterial resistance exists currently in the fourth-generation fluoroquinolone antibiotics, including moxifloxacin [8].

The general mechanism of action of the fluoroquinolone class is inhibition of type II topoisomerases DNA gyrase or topoisomerase IV (topoIV). Quinolone

Antibiotic deployment

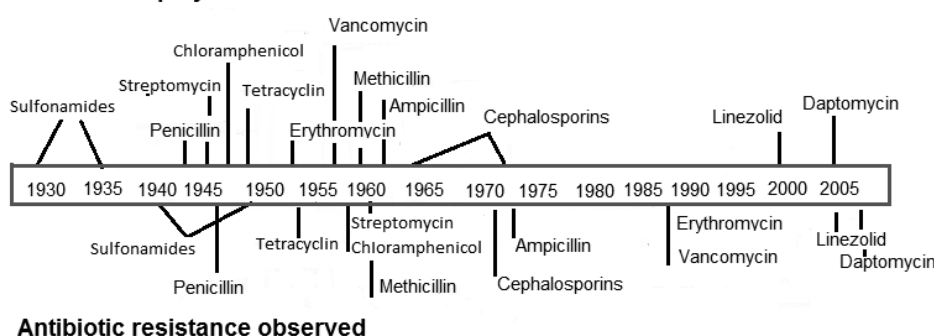


Fig. 1. The timeline showing the year of discovery of antibiotics (upper scale) and the year when resistance to antibiotics was revealed (lower scale).

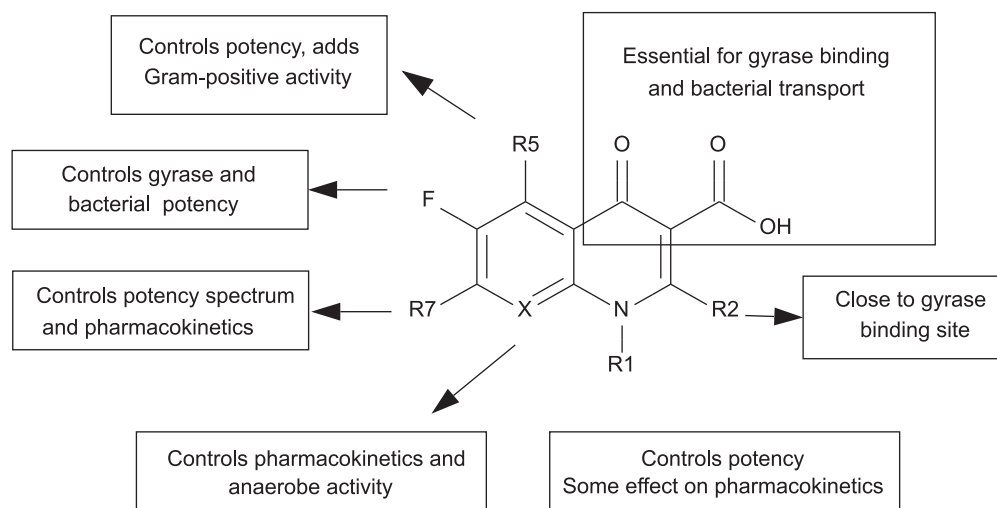


Fig. 2. The structure–activity relationship for fluoroquinolone antibiotics.

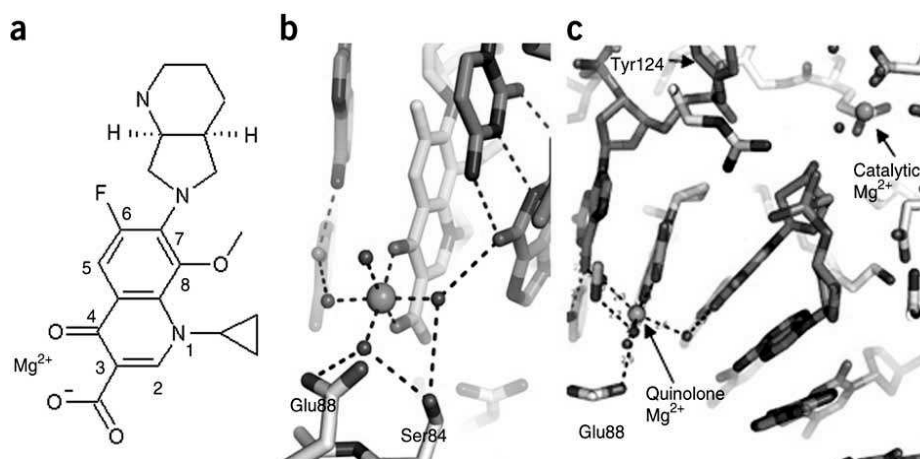
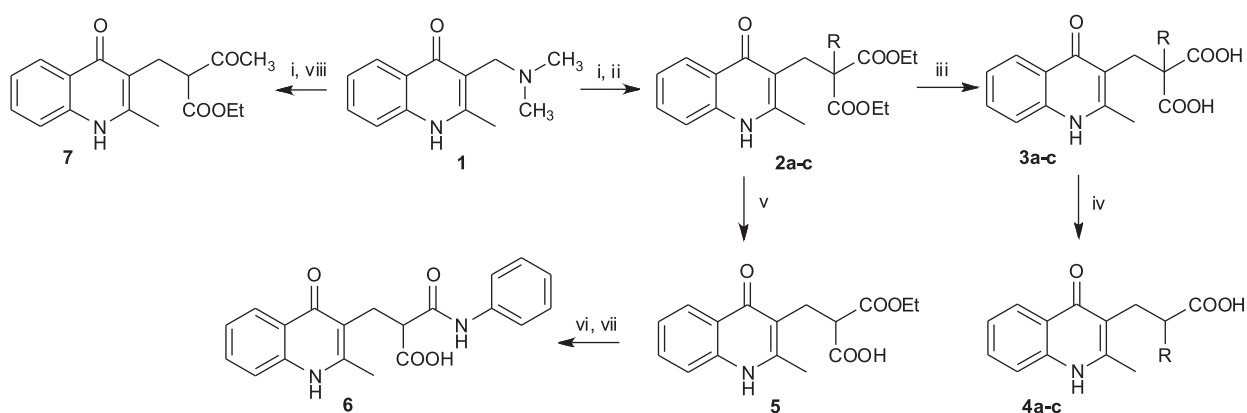


Fig. 3. (a) The structure of moxifloxacin with Mg^{2+} ion. (b) Moxifloxacin in the complex with ParE28-ParC58 and DNA at 3.27 Å. (c) The quinolone-bound Mg^{2+} is 14.5 Å from the 'Y site' catalytic Mg^{2+} .



2-4 a) R = H; 2b) R = NHCOCH₃; 2c) R = Bn

i - CH₃; ii - R-CH₂COOC₂H₅, EtONa; iii - aq. NaOH, AcOH; iv - aq. HBr; v - KOH, AcOH; vi - SOCl₂, PhNH₂; vii - aq. NaOH, AcOH; viii - CH₃COCH₂COOC₂H₅, EtONa.

Scheme 1

nes are capable to inhibit DNA synthesis that results in fragmented DNA and leads to the rapid bacterial cell death [9, 10]. For a long time the mechanism of action of fluoroquinolone antibiotics has not been well understood. In the middle of the 90s of the last century the structure-activity relationship was determined based upon experimental data. It has become a firm foundation for all subsequent modifications of the quinolone scaffold (Fig. 2) [11].

It is suggested that the carbonyl group in position 4 of the quinolone cycle and the carboxyl group at C-3 play the key role in the mechanism of action of fluoroquinolones; moreover, in SAR it has been stated that no modifications are possible without losing of the pharmacological effect. In addition, the X-ray study of the complex moxifloxacin with topoisomerase and DNA has shown that binding of fluoroquinolones occurs in a more complicated way with the participation of Mg^{2+} cation, which coordinates the carbonyl and carboxyl groups of quinolone and four water molecules (Fig. 3) [12].

Taking into account the latest data of the key role of magnesium in the cation complex forming quinolone-

topoisomerase-DNA the molecular modelling (force field MMFF94) for 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid with cation Mg^{2+} was carried out. The possibility of forming a strong complex between them was shown. Thus, the aim of this study was to elucidate the structure-antimicrobial activity relationship of various derivatives of quinolone-3-propanoic acid with the structures different from the generally accepted model of SAR quinolone antibiotics.

In order to reveal the possible regularities of the structure-activity relationship, within our assumed hypothesis on likelihood of the antimicrobial activity of quinolones with the carboxyl group bonded to the cycle via an alkyl linker our task was to synthesize derivatives of 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid having various substituents in α -position of the carboxylic group.

The synthesis of the target compounds was carried out according to Schemes 1 and 2. As the starting material 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one **1** was used, its quaternization with methyl iodide allowed to obtain an effective alkylating agent [13, 14].

The alkylation of malonic (**ii**) and acetoacetic ester (**vii**) was performed to form compounds **2a-c** and **7** without further isolation **1** from the reaction medium. Compounds **3a-c** and **4a-c** were obtained using the procedure previously known [13]. Monoacid **5** was obtained using the reaction of dimethyl 2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonate **2a** with the equimolar amount of potassium hydroxide, followed by acidification of the reaction medium with acetic acid. For the synthesis of 2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)-3-oxo-3-(phenylamino)propanoic acid **6** there were the following successive stages: obtaining of anilide monoacid **5** using thionyl chloride, and the alkaline hydrolysis of the ester group. Esters **8a-c** were prepared by reaction of acid **4a** with the 3-fold excess of the corresponding alcohols in the presence of thionyl chloride.

The structures of all compounds obtained were confirmed by the data of ^1H NMR spectroscopy and elemental analysis.

The antimicrobial activity of the compounds obtained was evaluated by the agar diffusion screening method ("well method") (Table 1) [15, 16].

The results obtained showed that the compounds synthesized had different levels of the antimicrobial activity, but two compounds **2b** and **4a** in the screening method showed a moderate activity against all microorganisms, including *Candida albicans*. Notably, 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid **4a** was the compound that showed the best spectrum of the antimicrobial activity of the sample. This fact agrees with our hypothesis of probability of antimicrobial active compounds, which are not related to the fluoroquinolone scaffold, but have the structural similarity with them and capable of forming a complex with Mg^{2+} cation.

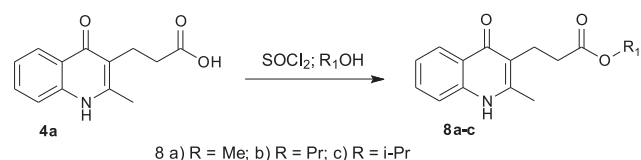
For the most promising compounds **2b** and **4a** the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the serial dilution method (Table 2).

The results have shown the low level of the antimicrobial activity of the test compounds, which is not quite consistent with the screening data. Thus, in order to completely confirm or refute the hypothesis of development of new antibiotics on the basis of 3-(4-quinolone-yl)propanoic acid it is necessary to expand the range of the compounds with this scaffold.

Experimental Part

Chemistry

Melting points were determined in open capillary tubes and were uncorrected. The proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were recorded on Varian Mercury VX-200 (200 MHz) in $\text{DMSO}-d_6$ using tetramethylsilane [$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$] as an internal standard. Elemental analysis was performed on an Elementar Vario EI elemental analyzer.



Scheme 2

3-Dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one **1**, diethyl 2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonate **2a**, diethyl 2-benzyl-2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonate **2c**, 2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonic acid **3a**, 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid **4a** and 2-benzyl-3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid **4c** were obtained using the method previously described [13]. Ethyl 2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)-3-oxobutanoate **7** was obtained using the method previously described [14].

Diethyl 2-acetamido-2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonate 2b. To 1.08 g (5 mmol) of 3-dimethylaminomethyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one in 20 ml in absolute ethanol add 0.5 ml (8 mmol) of methyl iodide, and stir the mixture at room temperature for 7 h. Then raise the temperature to 60°C , and keep the mixture under this temperature for an hour. Cool the solution to room temperature, then add 1.09 g (5 mmol) of 1,3-diethyl-2-acetamidopropanedioate, and with vigorous stirring by portions the solution of sodium ethylate prepared from 0.12 g of metal sodium (5.3 mmol) and 10 ml of absolute ethanol. Reflux the reaction mixture until disappearance of trimethylamine. Add water to the mixture, and acidify the solution to pH 5. Filter the resulting precipitate, wash and recrystallize from ethanol. Yield – 1.67 g (86%). M.p. – $264-266^\circ\text{C}$. ^1H NMR – δ , ppm – 11.45 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.98 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.66-7.37 (m, 2H), 7.22 (ddd, $J = 8.1, 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 4.09 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$; C, 61.85; H, 6.23; N, 7.21; found: C, 61.74; H, 6.24; N, 7.23.

2-Acetamido-3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid 4b. Heat 1.0 g (2.6 mmol) of diethyl 2-acetamido-2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonate 2b in 15 ml 50% solution of H_2SO_4 with 2 ml of THF at $110-120^\circ\text{C}$ for 6 h. To the reaction mixture add the solution of NaOH to adjust the alkaline medium (pH 4). Filter the resulting precipitate, wash and recrystallize from DMF. Yield – 0.52 g (70%). M.p – $285-287^\circ\text{C}$. ^1H NMR – δ , ppm – 12.49 (s, 1H), 11.60 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.06 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.69-7.41 (m, 2H), 7.27 (ddd, $J = 8.1, 6.7, 1.3$ Hz, 1H), 4.41-4.20 (m, 1H), 3.02-2.72 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.76 (s, 3H). Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$; C, 62.49; H, 5.59; N, 9.72; found: C, 62.37; H, 5.60; N, 9.75.

Table 1

Compound	Structure	Diameter of the growth inhibition zone in mm The number of the repeated experiments n = 3					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus Vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Basillus Subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida aibicans</i> ATCC 653/885
2a		14, 14, 15	15, 14, 13	growth	growth	21, 22, 20	growth
2b		18, 17, 18	18, 17, 18	15, 14, 14	15, 14, 15	25, 24, 25	18, 17, 17
3a		15, 14, 15	14, 15, 14	growth	growth	22, 21, 22	growth
4a		17, 18, 17	16, 18, 17	15, 14, 15	14, 15, 14	25, 24, 26	17, 16, 17
4b		15, 15, 16	15, 15, 14	growth	growth	20, 21, 22	growth
4c		16, 15, 17	15, 16, 15	growth	growth	20, 21, 20	growth
5		14, 13, 14	14, 14, 15	growth	growth	22, 23, 22	growth
6		14, 15, 15	14, 14, 14	growth	growth	23, 23, 22	14, 13, 14
7		15, 15, 14	14, 15, 14	growth	growth	22, 21, 22	growth
8a		13, 14, 14	14, 15, 14	12, 12, 13	13, 14, 13	21, 21, 22	growth
8b		13, 14, 15	14, 14, 13	12, 13, 12	12, 13, 12	22, 20, 20	growth
8c		15, 15, 14	14, 14, 13	growth	growth	21, 21, 22	growth

Table 2

Compound	The antibacterial activity of the samples (MIC, mg/ml) by the serial dilution method					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus Vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Basillus Subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida aibicans</i> ATCC 653/885
2b	100-150	125-175	> 500	> 500	50-100	150-200
4a	100-125	125-150	> 500	> 500	50-100	150-200

3-Ethoxy-2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)-3-oxopropanoic acid 5. To 0.67 g (2 mmol) of diethyl 2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)malonate **2a** add 0.12 g of potassium hydroxide dissolved in 15 ml of ethanol. Stir the reaction mixture at room temperature for 3 h. Evaporate the solvent under the pressure, acidify the residue with 1M acetic acid. Filter the resulting precipitate, wash and recrystallize from ethanol. Yield – 0.36 g (60%). M.p. – 263-265°C decomp. $^1\text{H NMR}$ – δ , ppm – 11.49 (s, 1H), 8.02 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.67-7.38 (m, 2H), 7.25 (ddd, $J = 8.0, 6.8, 1.3$ Hz, 1H), 4.14-3.80 (m, 3H), 2.93 (dd, $J = 7.4, 5.6$ Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_5$; C, 63.36; H, 5.65; N, 4.62; found: C, 63.26; H, 5.66; N, 4.57.

2-((2-Methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)-3-oxo-3-(phenylamino)propanoic acid 6. To 0.3 g (1 mmol) of 3-ethoxy-2-((2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl)-3-oxopropanoic acid **5** in 20 ml chloroform add 0.18 g (1.5 mmol) of thionyl chloride while cooling and stirring. Stir the reaction mixture for 4 h at room temperature, and then add dropwise 0.23 g (2.5 mmol) of aniline, leave the mixture overnight. Evaporate the solvent under the pressure until dryness. To the residue add 20 ml of 5M NaOH and reflux for 1 h. After acidification with dilute HCl solution filter the precipitate formed and recrystallize from butanol-1. Yield – 0.52 g (70%). M.p. – 294-296°C decomp. $^1\text{H NMR}$ – 11.41 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.06 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.65-7.36 (m, 4H), 7.24 (td, $J = 7.7, 2.6$ Hz, 3H), 6.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.05 (m, 3H), 3.28-2.82 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$; C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; found: C, 68.70; H, 5.19; N, 8.02.

Methyl 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoate 8a. To 0.46 g (2 mmol) of 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid **4a** in 20 ml chloroform add 0.48 g (4 mmol) of thionyl chloride while cooling and stirring. Stir the reaction mixture for 2 h at room temperature, and then add 0.2 g of methanol, boil the mixture for 3 h. Evaporate the solvent under the pressure until dryness. Treat the residue with 10% solution of NaHCO_3 . Filter the precipitate formed and recrystallize from methanol. Yield – 0.52 g (88%). M.p. – 258-259°C. $^1\text{H NMR}$ – 11.43 (s, 1H), 8.02 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.65-7.38 (m, 2H), 7.23 (ddd, $J = 8.1, 6.8, 1.3$ Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 2.72 (dd, $J = 8.6, 6.7$ Hz, 2H), 2.48 (m, 2H), 2.39 (s, 3H). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$; C, 68.56; H, 6.16; N, 5.71; found: C, 68.45; H, 6.17; N, 5.72.

Compounds **8b, c** were synthesized by the same procedure.

Propyl 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoate 8b. Crystd. from n-propanol. Yield – 0.41 g (76%). M.p. – 246-247°C. $^1\text{H NMR}$ – 11.41 (s, 1H), 8.03 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.66-7.38 (m, 2H), 7.23 (ddd, $J = 8.0, 6.6, 1.3$ Hz, 1H), 3.94 (t, $J = 6.6$ Hz,

2H), 2.73 (dd, $J = 8.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.49 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.53 (h, $J = 7.2$ Hz, 2H), 0.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$; C, 70.31; H, 7.01; N, 5.12; found: C, 70.18; H, 7.02; N, 5.14.

Isopropyl 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoate 8c. Crystd. from propanol-2. Yield – 0.39 g (71%). M.p. – 240-242°C. $^1\text{H NMR}$ – 11.41 (s, 1H), 8.03 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.66-7.38 (m, 2H), 7.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.85 (p, $J = 6.2$ Hz, 1H), 2.71 (dd, $J = 8.9, 6.5$ Hz, 2H), 2.49 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.13 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$; C, 70.31; H, 7.01; N, 5.12; found: C, 70.13; H, 7.00; N, 5.09.

The study of the antimicrobial activity

According the WHO recommendations such test strains as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653 were used [15, 16].

The microbial suspension was prepared using a Densi-La-Meter device (PLIVA-Lachema, Czech Republic; wavelength 540 nm) according to the instructions to the device and news letters about innovations in the Healthcare system (No.163-2006 “Standardization of preparation of microbial suspensions”, Kiev). Synchronization of cultures was carried out using a low temperature (4°C). The 18-24-hour old culture of the microorganisms tested was used. The bacterial suspension was inoculated onto the entire surface of Mueller-Hinton agar (“HIMedia Laboratories Pvt. Ltd India”). For *Candida albicans* agar Saburo (“HIMedia Laboratories Pvt. Ltd India”) was used. The bacterial concentration was 10^7 CFU/ml (determined by McFarland standard).

The compounds were introduced to the wells in the form of DMSO solution in the concentrations of 100 $\mu\text{g/ml}$; the open wells were filled with 0.3 ml of the solution.

Conclusions

Based upon latest data about the mechanism of action of antibacterial fluoroquinolones and occurrence of the antimicrobial resistance the synthesis of various derivatives of quinolone-3-propanoic acid with the structures that are different from the generally accepted model of SAR quinolone antibiotics has been performed, and their structure-antimicrobial activity relationship has been elucidated. Taking into account the latest data of the key role of magnesium in the cation complex forming quinolone-topoisomerase-DNA the molecular modelling for 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid with Mg^{2+} cation has been carried out.

The derivatives of 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-yl)propanoic acid having substituents in α -position of the acidic moiety of propanoic acid such as alkyl, carboxyl, acyl and acetamide substituents have been synthesized using 3-dimethylaminome-

thyl-2-methyl-1,4-dihydroquinoline-4-one as a versatile alkylating agent.

The results of the antimicrobial activity screening have shown that two compounds – 1,3-diethoxy-

2-[(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)methyl]-1,3-dioxopropan-2-ylcarbamic acid and 3-(2-methyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl)propanoic acid have a moderate broad-spectrum activity.

References

1. Esther T. Kok, Miek C. Jong, Barbara Gravendeel, Willem B. Van Leeuwen, Erik W. Baars. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2015, Article ID 521584, 6 pages, 2015. doi:10.1155/2015/521584.
2. Clatworthy A. E., Pierson E., & Hung D. T. *Nature Chemical Biology*, 2007, Vol. 3(9), pp.541-548. Cited 384 times. doi:10.1038/nchembio.2007.24.
3. Laxminarayan R. et al. *The Lancet Infectious Diseases*, 2015, Vol. 13(12), pp.1057-1098. Cited 214 times. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
4. *Antimicrobial resistance, Fact sheet No.194, Updated April 2015*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
5. Andriole Vincent T. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, Vol. 41, pp.113-119. Cited 102 times. doi: 10.1086/428051.
6. King D. E., Malone R., Lilley S. H. *Am Fam Physician*, 2000, Vol. 61(9), pp.2741-2748. Cited 128 times.
7. Ball P. J. *Antimicrob. Chemother.* 2000, Vol. 46, suppl 3, pp.17-24. doi: 10.1093/oxfordjournals.jac.a020889.
8. Oldenburg C., Lalitha P., Srinivasan M. etc. *Ophthalmic epidemiology*, 2013, Vol. 05, pp.20-23. Cited 2 times. doi: 10.3109/09286586.2013.790978.
9. Morais Cabral J. H., Jackson A. P., Smith C. V., Shikotra N., Maxwell A., Liddington R. C. *Nature*, 1997, Vol. 388(6645), pp.903-906. Cited 316 times.
10. Maxwell A. *Biochemical Society Transactions*, 1999, Vol. 27(2), pp.48-53. Cited 117 times.
11. Domagala J. M. J. *Antimicrob. Chemother.* 1994, Vol. 33 (4), pp.685-706. Cited 608 times. doi: 10.1093/jac/33.4.685.
12. Wohlkonig A., Chan P. F., Fosberry A. P., Homes P. et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, Sep, Vol. 17(9), pp.1152-1153. Cited 80 times. doi: 10.1038/nsmb.1892.
13. Zubkov V. O., Tsapko T. O., Gritsenko I. S., Rushchak N. I. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2011, Vol. 9, No.4, pp.38-41.
14. Zubkov V. O., Ruschak N. I., Kamenetska O. L., Gritsenko I. S. *Zhurnal organichnoi ta farmatsevtichnoi khimii – Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 2015, Vol. 13, No.4, pp.32-36.
15. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Document M100-S22*, 2012, Vol. 32, No.3, CLSI, Wayne, PA, January.
16. *American Society for Microbiology, Coyle M. B. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology: Washington, 2005, p.236.*

Надійшла до редакції 06.11.2015 р.

UDC 547.789

THE SYNTHESIS AND ANTICANCER PROPERTIES OF 2-(4-AMINO-5-METHYL-4H-[1,2,4]TRIAZOL-3-YLSULFANYL)-N-(5-R-BENZYLTHIAZOL-2-YL)-ACETAMIDES

Yu.V.Ostapiuk, V.S.Matiychuk, M.D.Obushak

Ivan Franko National University, Lviv

6, Kyryla i Mefodia Str., Lviv, 79005, Ukraine. E-mail: obushak@in.lviv.ua

Key words: 2-aminothiazole; 1,2,4-triazole derivatives; chloroacetamides; arylation; Meerwein reaction; 4-amino-1,2,4-triazole-3-thiole; anticancer activity

3-Aryl-2-chloropropanals 2a-h have been prepared by the reaction of arenediazonium chlorides 1a-h with acrolein in the conditions of Meerwein arylation (water-acetone, CuCl_2 as a catalyst). These aldehydes react with thiourea by refluxing in ethanol to obtain 2-amino-5-R-benzyl-1,3-thiazoles 3a-h ($R = 2\text{-Cl}$, 3-Cl, 4-Cl, 3- CF_3 , 2,4- Cl_2 , 2,5- Cl_2 , 3,4- Cl_2 , 3-Cl-4-Me) with high yields. The resulting 2-aminothiazoles were acylated with chloroacetic acid chlorides to form 2-chloro-N-(5-aryl-1,3-thiazol-2-yl)acetamides 4a-h with the yields of 68-91%. By the reaction of compounds 4a-h with 4-amino-5-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiole 5 a series of novel 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(5-R-benzylthiazol-2-yl)-acetamides 6a-h (71-86%) have been synthesized. These compounds have been evaluated for their anticancer activity against 60 cancer lines in the concentration of 10 μM . The human tumour cell lines were derived from nine different cancer types: leukemia, melanoma, lung, colon, CNS, ovarian, renal, prostate, and breast cancers. Among all the derivatives, compounds 6a-c, 6e,f ($R = 2\text{-Cl}$, 3-Cl, 4-Cl, 2,4- Cl_2 , 2,5- Cl_2) have been found to be active and have a high selectivity in relation to melanoma, while 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-[5-(2-chlorobenzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6a) and 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-[5-(3,4-dichlorobenzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6g) are active in relation to breast cancer.

СИНТЕЗ І ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ 2-(4-АМІНО-5-МЕТИЛ-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛ-3-ІЛСУЛЬФАНІЛ)-N-(5-R-БЕНЗИЛТІАЗОЛ-2-ІЛ)-АЦЕТАМІДІВ

Ю.В.Остап'юк, В.С.Матійчук, М.Д.Обушак

Ключові слова: 2-амінотіазол; похідні 1,2,4-тріазолу; хлорацетаміди; арилювання; реакція Меєрвейна; 4-аміно-[1,2,4]тріазол-3-тіол; протираковий активність

Взаємодією арендіазонієвих солей 1a-h з акролеїном у водно-ацетоновому середовищі за наявності катализатора хлориду міді(II) (умови реакції Меєрвейна) синтезовано 3-арил-2-хлоропропаналь 2a-h. Ці альдегіди реагують з тиосечовиною при нагріванні у спирті, утворюючи 2-аміно-5-R-бензил-1,3-тіазоли 3a-h ($R = 2\text{-Cl}$, 3-Cl, 4-Cl, 3- CF_3 , 2,4- Cl_2 , 2,5- Cl_2 , 3,4- Cl_2 , 3-Cl-4-Me) з високими виходами. Ацилюванням амінотіазолів 3a-h хлорангідридом хлороцтової кислоти за наявності триетиламіну одержано 2-хлор-N-(5-арил-1,3-тіазол-2-іл)ацетаміди 4a-h з виходами 68-91%. Кип'ятінням цих хлорацетамідів з еквімолярною кількістю 4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-тіолу 5 протягом 4 годин у присутності триетиламіну синтезували серію нових 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-ілсульфаніл)-N-(5-R-бензилтіазол-2-іл)-ацетамідів 6a-h, виходи яких складають 71-86%. Вивчена протиракова активність одержаних сполук. Досліджували протираковий активність щодо 60 ракових ліній в концентрації 10 мкМ. Лінії пухлинних клітин людини були отримані з дев'яти різних типів раку: лейкемії, меланоми, раку легень, товстої кишки, ЦНС, яєчників, нирок, простати, молочної залози. Встановлено, що сполуки 6a-c, 6e,f ($R = 2\text{-Cl}$, 3-Cl, 4-Cl, 2,4- Cl_2 , 2,5- Cl_2) найактивніші відносно ліній меланоми, а 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-ілсульфаніл)-N-[5-(2-хлорбензил)тіазол-2-іл]ацетамід (6a) і 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-ілсульфаніл)-N-[5-(3,4-дихлорбензил)тіазол-2-іл]ацетамід (6g) – відносно ліній раку молочної залози.

СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ 2-(4-АМИНО-5-МЕТИЛ-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛ-3-ІЛСУЛЬФАНІЛ)-N-(5-R-БЕНЗИЛТІАЗОЛ-2-ІЛ)-АЦЕТАМИДОВ

Ю.В.Остап'юк, В.С.Матійчук, М.Д.Обушак

Ключевые слова: 2-амінотіазол; производные 1,2,4-тріазола; хлорацетаміди; арилювання; реакція Меєрвейна; 4-аміно-[1,2,4]тріазол-3-тіол; противоопухолева активність

Взаимодействием арендіазонієвих солей 1a-h с акролеїном в водно-ацетоновій середі в присутстві катализатора хлориду міді(II) (умови реакції Меєрвейна) синтезовані 3-арил-2-хлоропропаналь 2a-h. Ці альдегіди реагують з тиосечовиною при нагріванні в спирті, образую 2-аміно-5-R-бензил-1,3-тіазоли 3a-h ($R = 2\text{-Cl}$, 3-Cl, 4-Cl, 3- CF_3 , 2,4- Cl_2 , 2,5- Cl_2 , 3,4- Cl_2 , 3-Cl-4-Me) с високими виходами. Ацилюванням амінотіазолів 3a-h хлорангідридом хлороцтової кислоти в присутстві триетиламіна отримані 2-хлор-N-(5-арил-1,3-тіазол-2-іл)ацетаміди 4a-h с виходами 68-91%. Кип'ятінням останніх с еквімолярним кількістю 4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-тіолу 5 на протязі 4 годин в присутстві триетиламіна синтезували серію нових 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-ілсульфаніл)-N-(5-R-бензилтіазол-2-іл)-ацетамідів 6a-h, виходи котрих складають 71-86%. Изучена противоопухолева активність отриманих сполук. Исследование противоопухолева активності сполук проводили на 60 линиях ракових клеток в концентрации 10 мкМ. Линии опухолевых клеток человека были получены из девяти различных типов рака: лейкемии, меланома, рака легких, толстой кишки, ЦНС, яичников, почек, простаты, молочной железы. Установлено, что соединения 6a-c, 6e,f ($R = 2\text{-Cl}$, 3-Cl, 4-Cl, 2,4- Cl_2 , 2,5- Cl_2) наиболее активны относительно линий меланома, а 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-ілсульфаніл)-N-[5-(2-хлорбензил)тіазол-2-іл]ацетамід (6a) и 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]тріазол-3-ілсульфаніл)-N-[5-(3,4-дихлорбензил)тіазол-2-іл]ацетамід (6g) – относительно линий рака молочной железы.

2-Aminothiazole is regarded as a privileged structure motif in medicinal chemistry due to its presence in the numerous pharmaceuticals and agrochemicals [1]. Their anti-inflammatory activity, as well as antiparasitic and antimicrobial action have led to three classes of these compounds with the trade names: Sudoxicam, Nitridazole and Sulfadimethoxine.

2-Aminothiazole derivatives possess the antimycobacterial [2] antiplasmodial [3], antifungal [4], antiplatelet [5], antiviral [6], hypoglycemic [7] and other activities. The anticancer studies of different 2-acylaminothiazole derivatives exhibited their potent inhibitory activity against a wide range of human cancerous cell lines [8–14]. Here we describe the synthesis and the anticancer evaluation of some novel 2-acylamino-5-arylmethylthiazole derivatives **6a-h**, several of which exhibited good activities.

Chemistry

Our syntheses of the corresponding 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(5-R-benzylthiazol-2-yl)-acetamides **6** are illustrated in Schemes 1 and 2. At the first stage acrolein was chloroarylated by diazonium salts in the presence of copper(II) chloride under Meerwein arylation conditions. Refluxing of 3-aryl-2-chloropropanals **2a-h** and thiourea in ethanol gave 5-substituted 2-aminothiazoles **3a-h** [15, 16],

To obtain chloroacetamides **4a-h** the corresponding 5-substituted 2-aminothiazoles **3a-h** were acylated with chloroacetyl chloride in a dry dioxane in the presence of triethylamine [10]. By the interaction of thiocarbonohydrazide with acetic acid 4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazole-3-thiole **5** was obtained.

The treatment of **4a-h** with 4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazole-3-thiole **5** gave the target compounds **6a-h** in the yields of 70-86%.

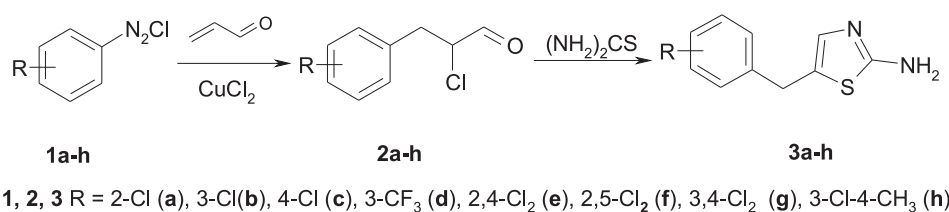
The composition and structure of the compounds synthesized were elucidated by ¹H NMR and microanalyses. In ¹H NMR spectrum, all protons were seen according to expected chemical shifts and integral values. The protons of the CH₃ and NH₂ group were observed at δ 2.29-2.30 and 5.78-5.79 ppm, respectively, while two methylene groups at δ 4.03-4.18 ppm.

Biological Activity

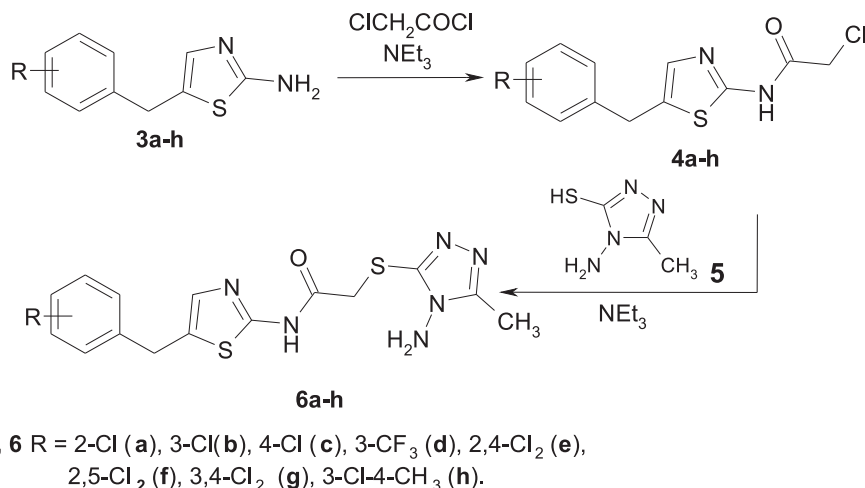
The 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(5-R-benzylthiazol-2-yl)-acetamides **5** synthesized were selected by the National Cancer Institute (NCI) Developmental Therapeutic Programme (www.dtp.nci.nih.gov) for the *in vitro* cell line screening to investigate their anticancer activity. Anticancer assays were performed according to the NCI protocol [17-20]. The compounds were evaluated for the antitumor activity against 60 cancer lines in the concentration of 10 μM. The human tumour cell lines were derived from nine different cancer types: leukemia, melanoma, lung, colon, CNS, ovarian, renal, prostate, and breast cancers. The screening results are shown in Table.

The compounds tested showed different levels of activity on various cancer cell lines. Compounds **5a-c**, **3e,f** have a selective effect on the growth of MDA-MB-435 (Melanoma) cancer cell lines and **5a,g** on MCF7 (breast cancer) in comparison with others.

Thus, the preparative method for obtaining of 2-chloro-N-(5-aryl-1,3-thiazol-2-yl) acetamides was developed, and 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]tri-



Scheme 1. Preparation of 2-amino-5-arylmethylthiazoles **2**.



Scheme 2. Preparation of 2-(4-amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-N-(5-R-benzylthiazol-2-yl)-acetamides **6**.

Table

The cytotoxic activity of the compounds tested in the concentration of 10^{-5} M against 60 cancer cell lines

Test compounds	Average growth, %	Range of growth, %	Most sensitive cell line growth, % (cancer line/type)
5a	76	19.36-110.14	KM12 54.45/Colon Cancer MDA-MB-435 37.22/Melanoma IGROV1 47.62/Ovarian Cancer OVCAR-5 51.68/Ovarian Cancer MCF7 19.36/Breast Cancer 786-0 3.81/Renal Cancer
5b	81	25.33-126.56	CCRF-CEM 51.42/Leukemia MOLT-4 58.84/Leukemia MDA-MB-435 25.33/Melanoma HCT-15 44.27/Colon Cancer
5c	79	22.21-108.95	CCRF-CEM 41.44/Leukemia HOP-62 54.14/Non-Small Cell Lung Cancer MDA-MB-435 22.21/Melanoma SF-268 70.84/CNS Cancer
4d	102	62.38-133.44	MALME-3M 62.38/ Melanoma
5e	88	35.77-126.56	RPMI-8226 59.22/Leukemia SR 58.21/Leukemia MDA-MB-435 35.67/Melanoma
5f	89	13.89-121.78	RPMI-8226 49.26/Leukemia SR 48.12/Leukemia NCI-H226 40.37/Non-Small Cell Lung Cancer MDA-MB-435 13.89/Melanoma
5g	91	24.75-110.99	PC-3 49.15/Prostate Cancer MCF7 24.75/Breast Cancer MDA-MB-231/ATCC 42.44/Breast Cancer
5h	110	42.27-146.81	MALME-3M 42.27/Melanoma

azol-3-ylsulfanyl)-N-(5-R-benzylthiazol-2-yl)-acetamides with the anticancer activity were synthesized.

Experimental Part

All starting materials were purchased from the commercial sources and used without purification. Melting points were uncorrected and were measured in open capillary tubes. The $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a Varian Gemini (400 MHz) in DMSO-d_6 , TMS was the internal standard.

The general procedure for the synthesis of 3-aryl-2-chloropropanals 2. Charge a three-necked flask equipped with a stirrer, a dropping funnel, and a gas-outlet tube (attached to a bubble counter) with 0.2 Mol (13.5 ml) of acrolein, 10 g of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 50 ml of acetone. Add dropwise a cold aqueous solution of arenediazonium chloride **1** (prepared by diazotization of 0.2 Mol of the corresponding aromatic amine) with vigorous stirring. Maintain the temperature in the range of 10-30°C. When the reaction is complete, the organic layer is separated. Extract the aqueous layer with chloroform. Combine the extract with the organic phase, dry over MgSO_4 , evaporate, and distill the residue under reduced pressure. Compounds **2a, c-g** were described earlier [15, 16].

2-Chloro-3-(3-chlorophenyl)propanal 2b. Yield – 38%. B.p. – 114°C/3 mm Hg. n_D^{20} 1.5500.

2-Chloro-3-(3-chloro-4-methylphenyl)propanal 2h. Yield – 45%. B.p. – 119°C/3 mm Hg. n_D^{20} 1.5380.

The general procedure for the synthesis of 2-amino-5-arylmethylthiazoles (3a-h). Heat the mixture of 0.8 g of thiourea and 0.01 Mol of aldehyde **2** in 10 ml of ethanol for 1.5-2 h under reflux. Cool the mixture, dilute with 100 ml of water, and make alkaline by adding aqueous ammonia. Filter the precipitate and recrystallize from CCl_4 or $\text{C}_6\text{H}_6\text{-CCl}_4$. Compounds **3a, c-g** were described earlier [15, 16].

5-(3-Chlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-ylamine 3b. Yield – 86%. M.p. – 99-101°C. $^1\text{H-NMR}$, d, ppm, (J, Hz): 3.89 (s, 2H, CH_2), 6.68 (s, 1H, $\text{H}_{\text{thiazol}}$), 6.55 (s, 2H, NH_2), 7.02–7.12 (m, 3H, C_6H_4), 7.13-7.16 (m, 1H, C_6H_4). Calculated, %: C 53.45, H 4.04, N 12.47. $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$. Found: C 53.10, H 3.98, N 12.32.

5-(3-Chloro-4-methylbenzyl)-1,3-thiazol-2-ylamine 3h. Yield – 80%. M.p. – 115-117°C. $^1\text{H-NMR}$, d, ppm, (J, Hz): 2.28 (s, 3H, CH_3), 3.85 (s, 2H, CH_2), 6.67 (s, 1H, $\text{H}_{\text{thiazol}}$), 6.54 (s, 2H, NH_2), 6.98–7.11 (m, 2H, C_6H_3), 7.17 (s, 1H, C_6H_3). Calculated, %: C 55.34, H 4.64, N 11.73. $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{S}$. Found: C 55.07, H 4.49, N 11.68.

The general procedure for the synthesis of *N*-(5-(*R*-benzyl)-1,3-thiazol-2-yl)-2-chloroacetamides (4a-h). To the mixture of appropriate 2-amino-5-arylmethylthiazole **3** (10 mmol) and 1.4 ml triethylamine in dioxane (25 ml) add dropwise chloroacetyl chloride (0.8 ml, 10 mmol) at 20–25°C. Dilute the mixture with 100 ml of water. Collect by filtration the solid product obtained, wash with water (10–20 ml) and recrystallize from the mixture of ethanol-DMF.

2-Chloro-*N*-[5-(2-chlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4a. Yield – 85%. M.p. – 175°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.17 (s, 4H, 2CH₂), 7.08 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.14–7.21 (m, 2H, C₆H₄), 7.28–7.35 (m, 2H, C₆H₄), 12.19 (s, 1H, NH). Calculated, %: C 47.85, H 3.35, N 9.30. C₁₂H₁₀Cl₂N₂OS. Found: C 47.54, H 3.18, N 9.07.

2-Chloro-*N*-[5-(3-chlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4b. Yield – 80%. M.p. – 158°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.11 (s, 2H, CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂), 7.25–7.36 (m, 5H, H_{thiazol}, C₆H₄), 12.17 (s, 1H, NH). Calculated, %: C 47.85, H 3.35, N 9.30. C₁₂H₁₀Cl₂N₂OS. Found: C 47.80, H 3.29, N 9.29.

2-Chloro-*N*-[5-(4-chlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4c. Yield – 87%. M.p. – 159°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.13 (s, 2H, CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂), 7.10–7.22 (m, 3H, H_{thiazol}, C₆H₄), 7.35 (d, 2H, J = 7.8, C₆H₄), 12.19 (s, 1H, NH). Calculated, %: C 47.85, H 3.35, N 9.30. C₁₂H₁₀Cl₂N₂OS. Found: C 47.48, H 3.13, N 9.09.

2-Chloro-*N*-[5-(3-trifluoromethylbenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4d. Yield – 75%. M.p. – 146°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.20 (s, 2H, CH₂), 4.23 (s, 2H, CH₂), 7.19 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.48–7.63 (m, 4H, C₆H₄), 12.15 (brs, 1H, NH). Calculated, %: C 46.65, H 3.01, N 8.37. C₁₃H₁₀ClF₃N₂OS. Found: C 46.30, H 2.90, N 8.08.

2-Chloro-*N*-[5-(2,4-dichlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4e. Yield – 90%. M.p. – 180°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.19 (s, 2H, CH₂), 4.23 (s, 2H, CH₂), 7.18 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.24 (d, 1H, ³J = 8.8, ⁴J = 2.0, 4-H C₆H₂), 7.40 (d, 1H, ³J = 8.8, 3-H C₆H₂), 7.44 (d, 1H, ⁴J = 2.0, 6-H C₆H₂), 12.19 (s, 1H, NH). Calculated, %: C 42.94, H 2.70, N 8.35. C₁₂H₉Cl₃N₂OS. Found: C 42.74, H 2.58, N 8.11.

2-Chloro-*N*-[5-(2,5-dichlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4f. Yield – 91%. M.p. – 207°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.20 (s, 2H, CH₂), 4.23 (s, 2H, CH₂), 7.19 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.25 (d, 1H, ³J = 8.8, ⁴J = 2.0, 4-H C₆H₂), 7.41 (d, 1H, ³J = 8.8, 3-H C₆H₂), 7.44 (d, 1H, ⁴J = 2.0, 6-H C₆H₂), 12.19 (s, 1H, NH). Calculated, %: C 42.94, H 2.70, N 8.35. C₁₂H₉Cl₃N₂OS. Found: C 42.60, H 2.50, N 8.05.

2-Chloro-*N*-[5-(3,4-dichlorobenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4g. Yield – 80%. M.p. – 200°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.19 (s, 2H, CH₂), 4.22 (s, 2H, CH₂), 7.16 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.21 (d, 1H, ³J = 8.8, ⁴J = 2.0, 6-H C₆H₂), 7.41 (d, 1H, ³J = 8.8, 5-H C₆H₂), 7.48 (d, 1H, ⁴J = 2.0, 2-H C₆H₂), 12.19 (s, 1H, NH). Calculated, %: C 42.94, H 2.70, N 8.35. C₁₂H₉Cl₃N₂OS. Found: C 42.65, H 2.53, N 8.09.

2-Chloro-*N*-[5-(3-chloro-4-methylbenzyl)-1,3-thiazol-2-yl]acetamide 4h. Yield – 68%. M.p. – 148°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 4.16 (s, 2H, CH₂), 4.20 (s, 2H, CH₂), 7.05–7.20 (m, 4H, H_{thiazol}, C₆H₄), 12.16 (brs, 1H, NH). Calculated, %: C 49.53, H 3.84, N 8.89. C₁₃H₁₂Cl₂N₂OS. Found: C 49.24, H 3.50, N 8.61.

The general procedure for the synthesis of 2-(4-amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-*N*-(5-*R*-benzylthiazol-2-yl)-acetamides (6a-h). Reflux the mixture of the corresponding *N*-(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl)-2-chloroacetamide **4** (5 mmol), 0.84 g of (5.5 mmol) of 4-amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazole-3-thiole **5**, and 1.2 ml of triethylamine for **4h** in ethanol (25 ml). Collect by filtration the solid products obtained, wash with ethanol (5–10 ml) and recrystallize from the mixture of ethanol-DMF.

2-(4-Amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-*N*-[5-(2-chloro-benzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6a). Yield – 73%. M.p. – 205–207°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.06 (s, 2H, CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂), 5.79 (s, 2H, NH₂), 7.15 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.24–7.28 (m, 2H, C₆H₄), 7.35 (d, J = 7.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.39 (d, J = 7.6 Hz, 1H, C₆H₄), 12.22 (brs, 1H, NHCO). Calculated, %: C 45.62, H 3.83, N 21.28. C₁₅H₁₅ClN₆OS₂. Found: C 45.34, H 3.65, N 20.97.

2-(4-Amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-*N*-[5-(3-chloro-benzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6b). Yield – 78%. M.p. – 212–214°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.06 (s, 2H, CH₂), 4.08 (s, 2H, CH₂), 5.80 (s, 2H, NH₂), 7.18–7.26 (m, 3H, H_{thiazol} + C₆H₄), 7.27 (d, J = 6.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C₆H₄), 12.25 (brs, 1H, NHCO). Calculated, %: C 45.62, H 3.83, N 21.28. C₁₅H₁₅ClN₆OS₂. Found: C 45.28, H 3.61, N 21.05.

2-(4-Amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-*N*-[5-(4-chloro-benzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6c). Yield – 80%. M.p. – 224–225°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.05 (s, 2H, CH₂), 4.06 (s, 2H, CH₂), 5.78 (s, 2H, NH₂), 7.15 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 2H, C₆H₄), 7.29 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C₆H₄), 12.22 (s, 1H, NHCO). Calculated, %: C 45.62, H 3.83, N 21.28. C₁₅H₁₅ClN₆OS₂. Found: C 45.41, H 3.70, N 20.99.

2-(4-Amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-*N*-[5-(3-trifluoromethylbenzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6d). Yield – 83%. M.p. – 192–193°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.28 (s, 3H, CH₃), 4.05 (s, 2H, CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂), 5.78 (s, 2H, NH₂), 7.19 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.50–7.55 (m, 3H, C₆H₄), 7.56–7.58 (m, 1H, C₆H₄), 12.23 (s, 1H, NHCO). Calculated, %: C 44.85, H 3.53, N 19.61. C₁₆H₁₅F₃N₆OS₂. Found: C 44.54, H 3.29, N 19.34.

2-(4-Amino-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-*N*-[5-(2,4-dichlorobenzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6e). Yield – 75%. M.p. – 253–254°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.05 (s, 2H, CH₂), 4.15 (s, 2H, CH₂), 5.78 (s, 2H, NH₂), 7.14 (s,

1H, H_{thiazol}), 7.30 (dd, $J_3 = 8.4$ Hz, $J_4 = 1.6$ Hz, 1H, C₆H₄), 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C₆H₄), 7.45 (d, $J_4 = 2.4$ Hz, 1H, C₆H₄), 12.25 (s, 1H, NHCO). Calculated, %: C 41.96, H 3.29, N 19.57. C₁₅H₁₄Cl₂N₆OS₂. Found: C 41.66, H 3.18, N 19.35.

2-(4-Amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-N-[5-(2,5-dichlorobenzyl)-thiazol-2-yl]-acetamide (6f). Yield – 85.7%. M.p. – 235-236°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.06 (s, 2H, CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂), 5.78 (s, 2H, NH₂), 7.18 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.27 (dd, $J_3 = 8.2$ Hz, $J_4 = 2.9$ Hz, 1H, C₆H₄), 7.41 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, C₆H₄), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, C₆H₄), 12.27 (s, 1H, NHCO). Calculated, %: C 41.96, H 3.29, N 19.57. C₁₅H₁₄Cl₂N₆OS₂. Found: C 41.60, H 3.16, N 19.63.

2-(4-Amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-N-[5-(3,4-dichlorobenzyl)-thiazol-2-

yl]-acetamide (6g). Yield – 78%. M.p. – 225-227°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.06 (s, 2H, CH₂), 4.08 (s, 2H, CH₂), 5.78 (s, 2H, NH₂), 7.18 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.21 (dd, $J_3 = 8.4$ Hz, $J_4 = 1.6$ Hz, 1H, C₆H₄), 7.43-7.48 (m, 2H, C₆H₄), 12.25 (s, 1H, NHCO). Calculated, %: C 41.96, H 3.29, N 19.57. C₁₅H₁₄Cl₂N₆OS₂. Found: C 42.03, H 3.38, N 19.40.

2-(4-Amino-5-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-N-[5-(3-chloro-4-methylbenzyl)thiazol-2-yl]-acetamide (6h). Yield – 71%. M.p. – 204-206°C. ¹H-NMR, d, ppm, (J, Hz): 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 4.03 (s, 2H, CH₂), 4.05 (s, 2H, CH₂), 5.78 (s, 2H, NH₂), 7.07 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, C₆H₄), 7.15 (s, 1H, H_{thiazol}), 7.19-7.23 (m, 2H, C₆H₄), 12.22 (s, 1H, NHCO). Calculated, %: C 46.99, H 4.19, N 20.55. C₁₆H₁₇ClN₆OS₂. Found: C 46.75, H 3.98, N 20.85.

References

- Muller G. *Drug Discov. Today*, 2003, Vol. 8, pp.681-691. Doi: 10.1016/S1359-6446(03)02781-8.
- Mjambili F, Njoroge M., Naran K., De Kock C., Smith P. J., Mizrahi V., Warner D., Chibale K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, Vol. 24, pp.560-564. Doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.022.
- Makam P, Kannan Th. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, Vol. 87, pp.643-656. Doi: 10.1016/j.ejmech.2014.09.086.
- Khalil A., Edwards J. A., Rappleye C. A., Tjarks W. *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, Vol. 23, pp.532-547. Doi:10.1016/j.bmc.2014.12.006.
- Pi Z., Sutton J., Lloyd J., Hua J., Price L., Wu Q., Chang M., Zheng J., Rehuss R., Huang C. S., Wexler R. R., Lam P. Y. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, Vol. 23, pp.4206-4209. Doi: 10.1016/j.bmcl.2013.05.025.
- Dicor A., Grand-Maotre C., Hucke O., O'Meara J., Kuhn C. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, Vol. 23, pp.3841-3847. doi:10.1016/j.bmcl.2013.04.077.
- Mokale S. N., Elgire R. D., Sakle N., Shinde D. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, Vol. 21, pp.682-685. Doi: 10.1016/j.bmcl.2010.12.011.
- Pattan S. R., Dighe N. S., Nirmal S. A., Merekar A. N., Musmade D. S., Laware R. B. *Asian J. Research Chem.*, 2009, Vol. 2, pp.196-201.
- El-Subbagh H. I., El-Naccar W. A., Badria F. A. *Qatar Univ. Sci. J.*, 1994, Vol. 14, pp.55-60.
- Kim K. S., Kimball S. D., Misra R. N., Rawlins D. B., Hunt J. T. et al. *J. Med. Chem.*, 2002, Vol. 45, pp.3905-3927. Doi: 10.1021/jm0201520.
- El-Subbagh H. I., Abadi A. H., Lehmann J. *Arch. Pharm. Med. Chem.*, 1999, Vol. 332, pp.137-142.
- Magd-El-Din A. A., Abd-El-All A. S., Roaiah M. F., El-Baroudy M. S. *J. Am. Sci.*, 2010, Vol. 6(5), pp.251-256. Doi: 10.7537/j.issn.1545-1003.
- Coe1 D., Armer R., Ratcliffe A. *Drugs Future*, 2009, Vol. 34, pp.247-254.
- Shao L., Zhou X., Hu Y., Jin Z., Liu J., Fang J. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, 2006, Vol. 36, pp.325-330. Doi: 10.1080/15533170600651405.
- Obushak N. D., Matiichuk V. S., Ganushchak N. I. *Russ. J. Org. Chem.* 1997. Vol. 33. No.7. pp.1010-1013 389 (English transl. from *Zh. Org. Khim.*, 1997, Vol. 33, pp.1081-1083).
- Obushak N. D., Matiichuk V. S., Vasylyshin R. Ya., Ostapyyuk Yu. V. *Russ. J. Org. Chem.* 2004, Vol. 40, pp.383-389 (English transl. from *Zh. Org. Khim.*, 2004, Vol. 40, pp.412-417). Doi: 10.1023/B:RUJO.0000034976.75646.85.
- Boyd M. R., Paull K. D. *Drug Dev. Res.*, 1995, Vol. 34, pp.91-109. Doi: 10.1002/ddr.430340203.
- Boyd M. R. In: *Cancer Drug Discovery and Development*. Teicher B. A., Ed.; Totowa, NJ, USA: Humana Press, 1997, Vol. 2, pp.23-43.
- Shoemaker R. H. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, pp.813-823. Doi: 10.1038/nrc1951.
- Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. J. *Nat. Cancer. Inst.*, 1991, pp. 757-766. Doi: 10.1093/jnci/83.11.757.

Надійшла до редакції 05.11.2015 р.

THE SYNTHESIS, REACTIVITY AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SUBSTITUTED THIENO[2,3-*d*]PYRIMIDINE-4(3H)-THIO(SELENO)NES

D.O.Kolomeitsev¹, V.I.Markov¹, V.O.Astakhina¹, S.I.Kovalenko², S.A.Varenichenko¹, O.V.Kharchenko¹

¹Ukrainian State University of Chemical Technology

8, av. Gagarina, Dnepropetrovsk, 49005, Ukraine. E-mail: dimakolomeicev@gmail.com

²Zaporozhye State Medical University

*Key words: thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3H)-thio(seleno)nes; alkylation; antibacterial activity*

*A new series of R1,R2-thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3H)-one, thione and selenone derivatives have been synthesized; the reaction of alkylation of the compounds obtained has been studied. Their structures have been confirmed by the NMR ¹H and mass spectra, and elemental analysis. The antibacterial and antifungal activities in vitro against three bacterial and two fungal pathogens have been revealed using the stiff plate agar diffusion method and the serial dilution method. The minimal bactericidal, fungicidal and bacteriostatic concentrations have been obtained. The pharmacological screening has shown that some of the compounds obtained possess a good antimicrobial activity. The culture of S.aureus. appeared to be the most sensitive to compound 10a. The best fungistatic indicators against A.niger have been found for compounds 4a and 9a.*

СИНТЕЗ, РЕАКЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ТА АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЗАМІЩЕНИХ ТІЄНО[2,3-*d*]ПІРИМІДИН-4(3H)-ТІО(СЕЛЕНО)НІВ

Д.О.Коломійцев, В.І.Марков, В.О.Астахіна, С.І.Коваленко, С.А.Варениченко, О.В.Харченко

Ключові слова: тієно[2,3-*d*]піримідин-4(3H)-тіо(селено)ни; алкілування; антибактеріальна активність
*Синтезовано ряд нових похідних R1,R2-тієно[2,3-*d*]піримідин-4(3H)-онів, тіонів і селенонів та вивчено реакцію алкілування отриманих продуктів. Структури отриманих продуктів встановлені за допомогою даних ЯМР ¹H та мас-спектрів і даних елементного аналізу. Антибактеріальну і фунгістатичну активність in vitro проти 3 культур бактерій і двох видів грибів було встановлено за допомогою методу дифузії речовини в агар і методу серійних розведень. Були визначені мінімальні концентрації бактеріальної, фунгістатичної і бактеріостатичної активності. Фармакологічне дослідження підтвердило, що деякі з отриманих продуктів проявляють добру антимікробну активність. Культура бактерії S.aureus. найбільш чутлива до сполуки 10a. Найкращі фунгістатичні показники проти цвільового гриба A.niger виявлені для сполук 4a і 9a.*

СИНТЕЗ, РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАМЕЩЕННЫХ ТИЕНО[2,3-*d*]ПИРИМИДИН-4(3H)-ТИО(СЕЛЕНО)НОВ

Д.О.Коломейцев, В.И.Марков, В.О.Астахина, С.И.Коваленко, С.А.Варениченко, А.В.Харченко

Ключевые слова: тиєно[2,3-*d*]піримідин-4(3H)-тіо(селено)ны; алкілювання; антибактеріальна активність

*Синтезован ряд нових производных R1,R2-тиєно[2,3-*d*]піримідин-4(3H)-онов, тиєнонов і селєнонов, изучена реакция алкілювання полученных соединений. Структуры полученных соединений установлены с помощью данных ЯМР ¹H и масс-спектров, а также данных элементного анализа. Антибактеріальная и фунгістатическая активність in vitro против трёх видов бактерий и двух видов грибов была обнаружена с помощью метода дифузії вещества в агар и метода серійного разведения. Определены минимальные концентрации бактеріальной, фунгіцидной и бактеріостатической активности. Фармакологическое исследование подтвердило, что некоторые из полученных продуктов проявляют хорошую антимікробную активність. Культура бактерии S.aureus наиболее чувствительна к соединению 10a. Наилучшие фунгістатические показатели против цвельового гриба A.niger определены для соединенной 4a и 9a.*

Thieno[2,3-*d*]pyrimidines are of great interest in pharmaceutical industry due to the potent physiological properties such as blood platelet aggregation inhibition, the antiviral and anti-inflammatory activity [1-3]. Molecular docking also shows that thieno[2,3-*d*]pyrimidines reveal the increased activity as inhibitors for PARP-1 (poly(ADP-ribose)-polymerase-1) [4]. Although the synthesis of thieno[2,3-*d*]pyrimidines has attracted much attention in organic synthesis, so far

only few methods have been reported for the synthesis of benzothieno[2,3-*d*]pyrimidines [5, 6]. Moreover, thieno[2,3-*d*]pyrimidines containing active functional groups are especially of great interest. The presence of different groups (R=O, S, Se) in position 4 of thieno[2,3-*d*]pyrimidine causes the possibility of further structural modification by different reagents. Thus, as part of our ongoing research in discovery of new biologically active thienopyrimidine deriva-

tives the aim of this work was to develop several simple and highly efficient methods of the synthesis of R_1, R_2 -thieno[2,3-*d*]pyrimidines **3a-c** and **4a-c**, the study their alkylation and antibacterial properties depending on atom in position 4 of the heterocycle.

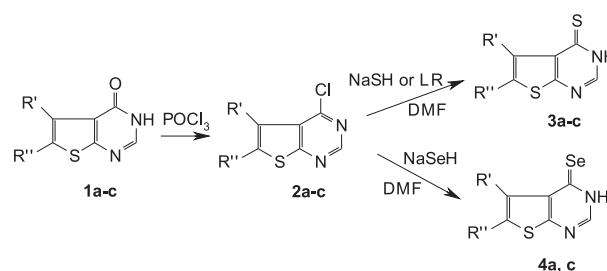
The synthesis strategy of the starting thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones **1a-c** was based on the classical Hewald reaction reported in the literature [7, 8]. Treatment of ketones with ethyl 2-cyanoacetate gave the corresponding 2-aminothiophene carboxylic esters that, in turn, gave compounds **1a-c** upon refluxing in formamide. Further compounds **1a-c** were converted into the corresponding 4-chlorothieno[2,3-*d*]pyrimidines **2a-c** under the action of phosphorus oxychloride and dimethylaniline. Thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-thiones **3a-c** and benzothieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-selenones **4a-c** were obtained upon treatment with such nucleophile compounds as NaHS(NaHSe) and Lawsan reagent, respectively (Scheme 1).

The presence of different reaction centres in thieno[2,3-*d*]pyrimidines **1a-c** and **3,4a-c** made possible to obtain a number of new potential biologically active compounds. The alkylation of the starting compounds **1a-c** was studied at 50-70°C in the presence of alkali (Scheme 2). The acidity of the NH group under these conditions provided the easy formation of the anion, which underwent alkylation.

Since substance **3a-c** can exist in the form of thiole and thione, the formation of both S- and N- derivatives could be expected depending on the reaction conditions. Thus, when pyrimidine-4(3*H*)-thiones **3a-c** are refluxed with NaOH and the corresponding derivatives of chloroacetic acid in ethanol, S-substituted derivatives are supposed to be obtained. However, the use of NaHCO₃ and DMF as a solvent did not lead to formation of N-substituted derivatives as it was expected. It was found that the alkylation occurred at the more nucleophilic sulphur atom in both cases (Scheme 3). All the final products were isolated as crystalline substances with a high melting point (Table 4). The structures of the compounds obtained were confirmed by IR- and NMR ¹H spectroscopy (Table 5).

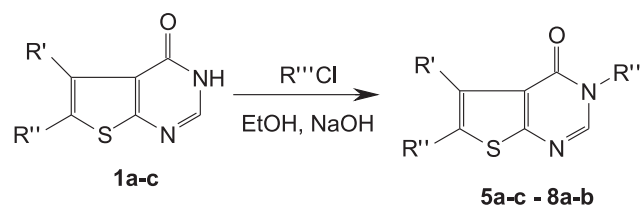
The formation of the energetically preferable aromatic system was confirmed by the chemical shift of the signal of protons of the -CH group (8.7-8.9 ppm) in ¹H NMR spectra compared to the basic values. In the case of N-alkylation such an effect could not be observed.

All the compounds synthesized were screened for their antimicrobial and antifungal activities. The results of the antimicrobial screening by the stiff plate agar diffusion method are given in Table 1. The results of the antimicrobial and antifungal screening by the serial dilution method are presented in Table 2 and 3. Substances that did not reveal the antimicrobial and antifungal activity were not included in Tab-



Scheme 1. The synthesis of key precursors **1a-c-4a-b**.

When: a – R'-R'' = -(CH₂)₄; b – R'-R'' = -(CH₂)₃; c – R'-R'' = CH₃.



Scheme 2. Alkylation of compounds **1a-c**.

When: **1a** – R'-R'' = -(CH₂)₄; **1b** – R'-R'' = -(CH₂)₃; **1c** – R'-R'' = CH₃;

5a – R'-R'' = -(CH₂)₄, R''' = -CH₂-CO-OC₂H₅; **5b** – R'-R'' = -(CH₂)₃,

R''' = -CH₂-CO-OC₂H₅; **5c** – R'-R'' = CH₃, -CH₂-CO-OC₂H₅;

6a – R'-R'' = -(CH₂)₄, R''' = -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl;

6b – R'-R'' = -(CH₂)₃, R''' = -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl;

6c – R'-R'' = CH₃, -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl; **7a** – R'-R'' = -(CH₂)₄,

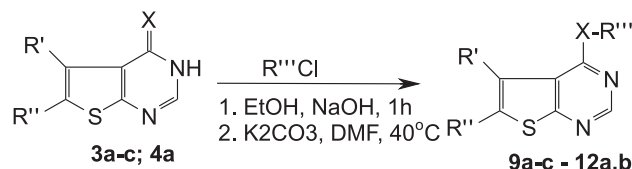
R''' = (5-isopropyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-oxoethyl; **7b** – R'-R'' = -(CH₂)₃,

R''' = (5-isopropyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-oxoethyl; **7c** – R'-R'' = CH₃,

R''' = (5-isopropyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-oxoethyl; **8a** – R'-R'' =

-(CH₂)₄, R''' = -CH₂-NH-CO-Ph; **8b** – R'-R'' = -(CH₂)₃,

R''' = -CH₂-NH-CO-Ph; **8c** – R'-R'' = CH₃, R''' = -CH₂-NH-CO-Ph.



Scheme 3. Alkylation of compounds **3a-c-4a**.

When: **3a** – R'-R'' = -(CH₂)₄, X=S; **3b** – R'-R'' = -(CH₂)₃, X=S;

3c – R'-R'' = CH₃, X=S; **4a** – R'-R'' = -(CH₂)₄, X=Se;

9a – R'-R'' = -(CH₂)₄, R''' = -CH₂-CO-OC₂H₅, X=S; **9b** – R'-R'' = -(CH₂)₃,

R''' = -CH₂-CO-OC₂H₅, X=S; **9c** – R'-R'' = CH₃, -CH₂-CO-OC₂H₅, X=S;

10a – R'-R'' = -(CH₂)₄, R''' = -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl, X=S;

10b – R'-R'' = -(CH₂)₃, R''' = -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl, X=S;

10c – R'-R'' = CH₃, -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl, X=S;

11a – R'-R'' = -(CH₂)₄, R''' = (5-isopropyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-

2-oxoethyl, X=S; **11b** – R'-R'' = -(CH₂)₃, R''' = (5-isopropyl-1,3,4-

thiadiazol-2-yl)-2-oxoethyl, X=S; **11c** – R'-R'' = CH₃, R''' = (5-isopropyl-

1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-oxoethyl, X=S; **12a** – R'-R'' = -(CH₂)₄, X=Se;

R''' = -CH₂-CO-NH-SO₂-C₆H₄-Cl; **12b** – R'-R'' = -(CH₂)₃, X=Se,

R''' = (5-isopropyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-oxoethyl.

les. According to the stiff plate agar diffusion method compounds **4a** and **4c** revealed a significant activity against *E. coli*, *S. aureus*, and *M. luteum* appeared to be sensitive only to compound **10a**.

The best fungistatic indicators against *A. niger* were estimated for substances **4a** and **9a**. The diameter of the inhibition zones of the microbial growth for compound **4a** was 22.0 and 12.0 mm in the concentrations of 0.5 and 0.1%, respectively. MIC of **4a** and **9a** were 31.2 µg/mL.

Table 1

The antimicrobial activity of the compounds synthesized (the stiff plate agar diffusion method)

Compound ^{a)}	Concentration, %	The inhibition zones of the compounds studied (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteum</i>	<i>A. niger</i>
1c	0.5	–	–		7.0
2c	0.5	–	–		8.0
4a	0.5	14.0 (b/a)	–		22.0 (f/a)
	0.1	–	–	–	12.0 (f/a)
4c	0.5	14.7	–	–	–
	0.1	10.0	–	–	–
7c	0.5	–	–	–	–
10a	0.5	–	12.0	17.0	–

^{a)}Compounds **1a**, **4b**, **5a-7b**, **8a-12b** in the concentration of 0.5 and 1.0 % did not inhibit bacteria and fungi selected; b/a – bacteriostatic action; f/a – fungistatic action; – have not been found.

Table 2

The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) of the compounds synthesized (serial dilution method)

Compound ^{a)}	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>M. luteum</i>	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
1c	+	+	+	+	250.0	500.0
4c	500.0	*	+	+	+	+
5c	+	+	+	+	500.0	*
6c	+	+	+	+	500.0	*
7c	+	+	+	+	31.2	125.0
10a	+	+	31.2	125.0	31.2	125.0
11a	+	+	31.2	62.5	+	+

^{a)}Compounds **1a-b**, **2a-4b**, **5a-b**, **6a-b**, **7a-b**, **8a-9c**, **10b-c**, **11b-12b** did not reveal the antibacterial activity in the concentrations tested;

^{b)} + The antibacterial activity was not observed in the concentrations tested; ^{c)} * The antibacterial activity was not determined in the concentrations tested.

Table 3

The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal fungicidal concentration (MFC) of the compounds synthesized (serial dilution method)

Compound ^{a)}	<i>Candida tenuis</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
1c	125.0	250.0	125.0	*
3c	+	+	62.5	250.0
4a	+	+	31.2	*
5b	+	+	250.0	500.0
5c	+	+	500.0	*
6c	125.0	*	500.0	*
8a	250.0	*	500.0	*
9a	+	+	31.2	*

^{a)}Compounds **1a-b**, **2a-3b**, **4b-c**, **5a**, **6a-b**, **7a-c**, **8b-c**, **9b-c**, **10a-12b** did not reveal the antifungal activity in the concentrations tested;

^{b)} * The antifungal activity was not determined in the concentrations tested; ^{c)} + The antifungal activity was not observed in the concentrations tested.

Table 4Physicochemical properties of alkylation compounds **5a-12b**

Compd No	Yield, %	M.p., °C	Found, %			Mol. formula M.w	Calc, %		
			C	H	N		C	H	N
5a	77	276	57.52	5.56	9.58	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	57.52	5.52	9.58
5b	87	236	56.12	5.10	10.09	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	56.10	5.07	10.06
5c	83	281	54.12	5.27	10.50	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	54.12	5.30	10.52
6a	81	297	49.36	3.66	9.58	C ₁₈ H ₁₆ ClN ₃ O ₄ S	49.37	3.68	9.60
6b	59	251	49.71	3.69	6.82	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ S	49.69	3.68	6.82
6c	79	312	48.21	3.36	9.89	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₄ S	48.17	3.33	9.91
7a	71	307	55.68	5.19	14.43	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₂ S ₂	55.65	5.19	14.42
7b	67	257	54.52	4.85	14.96	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₂ S ₂	54.53	4.84	14.96
7c	86	327	53.05	5.02	15.47	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₂ S ₂	53.02	5.01	15.46
8a	68	286	63.74	5.07	12.41	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	63.70	5.05	12.38
8b	92	298	61.36	4.85	13.41	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	61.32	4.82	13.41
9a	57	231	54.57	5.23	9.11	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂	54.52	5.23	9.08
9b	72	245	63.74	5.07	12.41	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	63.70	5.05	12.38
9c	65	261	51.09	5.07	9.93	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	51.04	5.00	9.92
10a	77	279	46.43	3.14	9.59	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃ O ₃ S ₃	46.41	3.21	9.55
11a	69	277	53.20	5.48	13.80	C ₁₈ H ₂₂ N ₄ OS ₃	53.17	5.45	13.78
11b	83	289	52.04	5.14	14.30	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ OS ₃	52.01	5.14	14.27
11c	75	269	50.55	5.34	14.75	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ OS ₃	50.50	5.30	14.72
12a	68	286	60.82	4.82	11.82	C ₁₈ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S ₂ Se	60.82	4.82	11.82
12b	52	256	47.94	4.45	12.38	C ₁₈ H ₂₀ ClN ₄ OS ₂ Se	47.89	4.47	12.41

Table 5The data of IR and ¹H NMR spectral of alkylation compounds 5a-12b

Compd	IR ATR, cm ⁻¹	NH	Pyrimidine CH	Aliphatic protons	Aromatic protons
1	2	3	4	5	6
5a			8.3 (1H, s, CH)	4.77 (2H, s, CH ₂); 4.17-4.22 (2H, q, J=6.95 Hz, CH ₂); 2.9-2.5 (8H, m, 4CH ₂); 1.3 (3H, t, J=6.95 Hz, CH ₃)	
5b			8.3 (1H, s, CH)	4.7 (2H, s, CH ₂); 4.11-4.12 (2H, q, J=6.99 Hz, CH ₂); 2.9-2.8 (4H, m, 2CH ₂); 2.4-2.3 (2H, m, CH ₂); 1.17-1.24 (3H, t, J=6.94 Hz, CH ₃)	
5c			8.3 (1H, s, CH)	4.7 (2H, s, CH ₂); 4.14-4.18 (2H, q, J=7.0 Hz, CH ₂); 2.37 (6H, s, 2CH ₃); 1.18-1.24 (3H, t, J=6.97 Hz, CH ₃)	
6a		12.6 (1H, s, NH)	8.17 (1H, s, CH)	4.69 (2H, s, CH ₂); 2.74-2.2.68 (4H, m, 2CH ₂); 1.74-1.66 (4H, m, 2CH ₂)	7.91 (2H, d, J=8.78 Hz, Ar-H); 7.72 (2H, d, J=8.42 Hz, Ar-H)
6b		12.6 (1H, s, NH)	8.3 (1H, s, CH)	4.6 (2H, s, CH ₂); 2.75-2.9 (4H, m, 2CH ₂); 2.3-2.4 (2H, m, CH ₂)	7.92 (2H, d, J=8.74 Hz, Ar-H); 7.7 (2H, d, J=8.79 Hz, Ar-H)
6c		12.6 (1H, s, NH)	8.17 (1H, s, CH)	4.7 (2H, s, CH ₂); 2.31-2.33 (6H, s, 2CH ₃)	7.91 (2H, d, J=8.74 Hz, Ar-H); 7.70 (2H, d, J=8.74 Hz, Ar-H)
7a		12.95 (1H, s, NH)	8.3 (1H, s, CH)	4.94 (2H, s, CH ₂); 2.75-2.82 (5H, m, 2CH ₂); 1.76-1.64 (4H, m, 2CH ₂); 1.3 (6H, d, J=6.4 Hz, 2CH ₃)	

Continuation Table 5

1	2	3	4	5	6
7b		12.96 (1H, s, NH)	8.3 (1H, s, CH)	4.96 (2H, s, CH ₂); 2.72-2.88 (5H, m, 2CH ₂); 2.35-2.4 (2H, m, CH ₂); 1.31 (6H, d, J=6.49 Hz, 2CH ₃)	
7c		12.94 (1H, s, NH)	8.3 (1H, s, CH)	4.94 (2H, s, CH ₂); 2.35 (6H, s, 2CH ₃); 1.32 (6H, d, J=6.51 Hz, 2CH ₃)	
8a		9.6 (1H, br s, NH)	8.48 (1H, s, CH)	5.4 (2H, d, J=6.58 Hz, CH ₂); 2.72-2.88 (4H, m, 2CH ₂); 1.7-1.83 (4H, m, 2CH ₂)	7.88 (2H, m, Ar-H); 7.5 (3H, m, Ar-H)
8b		9.39 (1H, br s, NH)	7.98 (1H, s, CH)	4.7 (2H, d, J=6.56 Hz, CH ₂); 2.34 (6H, s, 2CH ₃)	7.8 (2H, m, Ar-H); 7.5 (3H, m, Ar-H)
9a	2985, 2937, 2857, 2751, 2674, 1413, 1257, 1071, 809, 732		8.65 (1H, s, CH)	4.16-4.14 (4H, m, 2CH ₂); 2.8-3.0 (4H, m, 2CH ₂); 1.6-1.83 (4H, m, 2CH ₂); 1.14-1.21 (3H, t, J=6.99 Hz, CH ₃)	
9b	2999, 2974, 2908, 2853, 1744, 1667, 1452, 1175, 1086, 853, 781, 742		8.3 (1H, s, CH);	4.79 (2H, s, CH ₂); 4.14-4.19 (2H, q, J=7.12 Hz, CH ₂); 2.9-3.07 (4H, m, 2CH ₂); 2.37-2.42 (2H, m, CH ₂); 1.1 (3H, t, J=6.95 Hz, CH ₃)	
9c	2978, 2908, 2860, 1738, 1535, 1166, 882, 629		8.63 (1H, s, CH)	4.03-4.13 (4H, m, 2CH ₂); 2.44 (6H, s, 2CH ₃); 1.11-1.18 (3H, t, J=6.99 Hz, CH ₃)	
10a		12.3 (1H, s, NH)	8.5 (1H, s, CH)	4.1 (2H, s, CH ₂); 3.0-3.2 (4H, m, 2CH ₂); 2.1-2.3 (2H, m, CH ₂)	7.8 (3H, m, CH _{ar}); 7.4 (2H, m, CH _{ar})
11a		12.6 (1H, s, NH)	7.94 (1H, s, CH)	4.37 (2H, s, CH ₂); 2.77-2.88 (4H, m, 2CH ₂); 2.0-2.06 (5H, m, 2CH ₂); 1.3 (6H, d, J=6.99 Hz, 2CH ₃)	
11b	2964, 2931, 2901, 2858, 1461, 1235, 829, 749	12.9 (1H, s, NH)	8.66 (1H, s, CH)	4.4 (2H, s, CH ₂); 3.04-3.10 (7H, m, 3CH ₂); 1.3 (6H, d, J=6.59 Hz, 2CH ₃)	
11c	3047, 2984, 2821, 2705, 1518, 1236, 924, 838	12.8 (1H, br s, NH)	8.38 (1H, s, CH)	4.38 (2H, s, CH ₂); 2.55 (6H, s, 2CH ₃); 1.3 (6H, d, J=6.99 Hz, 2CH ₃)	
12a		12.5 (1H, s, NH)	8.4 (1H, s, CH)	4.07 (2H, s, CH ₂); 2.82-2.92 (4H, m, 2CH ₂); 1.74-1.83 (4H, m, 2CH ₂)	7.9 (2H, d, J=8.78 Hz, Ar-H); 7.5 (2H, d, J=8.42 Hz, Ar-H)
12b	2929, 2867, 2834, 2696, 1408, 1316, 1152, 1076, 769, 618	12.75 (1H, s, NH)	8.66 (1H, s, CH)	4.36 (2H, s, CH ₂); 2.82-2.98 (5H, m, 2CH ₂); 1.8-1.7 (4H, m, 2CH ₂); 1.1 (6H, d, J=6.62 Hz, 2CH ₃)	

According to the serial dilution method the growth of *S. aureus* was mostly inhibited by compounds **10a** and **11a** in the concentrations of 31.2 µg/mL. *E. coli* appeared to be almost insensitive to the compounds synthesized in the concentrations tested. Only compounds **4c** revealed a weak inhibitory activity against it (MIC = 500.0 µg/mL). Compounds **7c** and **10a** had the moderate antibacterial activity against *M. luteum* (MIC = 31.2 µg/mL).

Experimental Part

Chemical Part

The ¹H NMR spectra were recorded in DMSO-d₆ on a Varian Mercury VX-200 instrument (200 MHz). The internal standard for the NMR spectra was TMS. IR spectra (4000-600 cm⁻¹) were recorded on a Bruker ALPHA

FTIR spectrometer using a module for measuring attenuated total reflection (ATR) on a Bruker Tensor 27 spectrometer (KBr) and expressed in cm⁻¹. The mass spectra were recorded on a Varian 1200L instrument with direct injection of the sample at 250°C and 70eV ionizing electrons. Elemental analysis was performed on a LECO CHNS-900 instrument. Melting points were determined in open capillary tubes and were uncorrected. The reaction and the purity of the compounds obtained were monitored by TLC on Merck Silicagel 60 F-254 plates with 10:1 CHCl₃-2-ProOH as an eluent.

Compounds **1a-c** and **2a-c** were synthesized by the method described in the literature [7, 8].

5,6-Dimethylthieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one 1c: A white powder. M.p. -268°C. yield - 90%;

$^1\text{H NMR}$: 12.3 (1H, *br s*, N-H). 8.0 (1H, *br s*, =C-H), 2.31 (3H, *s*, CH₃), 2.34 (3H, *s*, CH₃); Found, %: C 53.33; H 4.47; N 15.54. C₈H₈N₂O₅. Calculated, %: C 53.31; H 4.47; N 15.54.

The general procedure of the synthesis of compounds 2a-c: Dissolve compounds **1a-c** (12 g) in phosphorus oxychloride, and then add gradually dimethylaniline 14 ml (0.11 Mol). Heat the reaction mixture for 4 h, evaporate the excess of phosphorous oxychloride under reduced pressure, neutralize the solid residue with 5% aq Na₂CO₃ solution. Filter the precipitate formed and recrystallize from toluene.

4-Chloro-5,6-dimethylthieno[2,3-d]pyrimidine 2c: a light yellow powder, yield – 96%, calculated for the structure proposed. M.p. – 117°C. This intermediate chlorpyrimidine was used at the next step without purification.

The general procedure of the synthesis of compound 3a-c – method A: Dissolve compounds **2a-c** (0.0084 Mol) in DMF, add the solution of sodium hydrosulfide (1 g, 0.0179 Mol). Stir the mixture obtained for 24 h at room temperature, adjust pH to ~7.0 with aq NaOH solution (15 mL). Add hydrochloric acid to the filtrate and recrystallize the white precipitate obtained from CH₃CN.

Method B: Reflux the mixture of compounds **2a-c** (0.0084 Mol) and the Lawsan reagent (0.0084 Mol) in 15 mL of 1,4-dioxan for 6 h and filter hot. Recrystallize the precipitate obtained from CH₃CN.

5,6,7,8-Tetrahydro[1]benzothieno[2,3-d]pyrimidine-4(3H)-thione (3a): A yellow powder. Yield – 75%. M.p. – 213°C; $^1\text{H NMR}$: 13.5 (1H, *br s*, NH). 8.0 (1H, *br s*, CH), 2.8-2.9 (4H, *m*, 2CH₂), 1.6-1.9 (4H, *m*, 2CH₂). MS: *m/z* (I,%) – 222 (96%) [M]⁺. Found, %: C 54.05; H 4.52; N 12.60. C₁₀H₁₀N₂S₂. Calculated, %: C 54.02; H 4.53; N 12.60.

3,5,6,7-Tetrahydro-4H-cyclopenta[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine-4-thione (3b): A yellow powder. Yield – 60%. M.p. – 223-224°C; $^1\text{H NMR}$: 12.6 (1H, *br s*, N-H). 7.9 (1H, *br s*, C-H), 2.9-3.0 (2H, *m*, CH₂), 2.0-2.2 (4H, *m*, 2CH₂); MS: *m/z* (I,%) – 208 (77%) [M]⁺. Found, %: C 51.91; H 3.87; N 13.45. C₉H₈N₂S₂. Calculated, %: C 51.90; H 3.87; N 13.45;

5,6-Dimethylthieno[2,3-d]pyrimidine-4(3H)-thione (3c): A yellow powder. Yield – 62%. M.p. – 239-240°C; $^1\text{H NMR}$: 13.0 (1H, *br s*, NH). 8.4 (1H, *br s*, CH), 2.1 (3H, *s*, CH₃), 2.4 (3H, *s*, CH₃). MS: *m/z* (I,%) – 208 (77%) [M]⁺. Found, %: C 48.95; H 4.11; N 14.25. C₈H₈N₂S₂. Calculated, %: C 48.95; H 4.11; N 14.27.

The general procedure of the synthesis of compound 4a-c: Add selenium (0.0012 Mol) gradually to absolute ethanol (50 mL) with stirring on an ice bath. After that gradually add sodium hydroborate 0.4 g (0.0032 Mol) to the solution for 15 min. Stir the resulting mixture for 1.5 h until selenium is completely dissolved. Dissolve compounds **2a-c** in ethanol, cool and add to the solution of sodium hydroselenide.

Stir the reaction mixture under nitrogen for 3 h. Then pour the solution into the mixture of hydrochloric acid (100 mL) and ice (50 mL). Filter the precipitate formed and recrystallize from aq MeOH.

5,6,7,8-Tetrahydro[1]benzothieno[2,3-d]pyrimidine-4(3H)-selenone (4a): A yellow powder. Yield – 65%. M.p. – 190°C; $^1\text{H NMR}$: 12.9 (1H, *s*, NH); 8.1 (1H, *s*, CH); 4.6 (2H, *s*, CH₂); 2.8-3.0 (4H, *m*, 2CH₂). Found, %: C 44.62; H 3.76; N 10.42. C₁₀H₁₀N₂SSe. Calculated, %: C 44.61; H 3.74; N 10.41.

5,6-Dimethylthieno[2,3-d]pyrimidine-4(3H)-selenone (4c): A yellow powder. Yield – 55%. M.p. – 200°C; IR (ATR, cm⁻¹): 3116, 3036, 2965, 2910, 2840, 2766, 1679, 1563, 1485, 1406, 1352, 1294, 1212, 1144, 1040, 925, 812, 705, 604. $^1\text{H NMR}$: 13.1 (1H, *s*, NH); 8.0 (1H, *s*, CH); 2.9 (3H, *s*, CH₃); 2.2 (3H, *s*, CH₃). MS: *m/z* (I,%) – 243 (85%) [M]⁺. Found, %: C 39.51; H 3.34; N 11.54. C₈H₈N₂SSe. Calculated, %: C 39.51; H 3.32; N 11.52.

The general procedure of alkylation of compounds 1a-c: To the suspension of compound **1a-c** (0.0044 Mol) in ethanol (5 ml) add 0.1 g (0.0044 Mol) of sodium hydroxide and heat for 10 min. When compounds are dissolved, add the corresponding alkylating agent (0.0044 Mol), and reflux the mixture for 30-40 min at 70°C. Filter the precipitate formed and recrystallize from aq MeOH.

The general procedure of alkylation of compounds **3a-c – method A:** Heat the mixture of compounds **3a-c** (0.0044 Mol) and potassium carbonate 0.8 g (0.0061 Mol) in DMF (5 ml) at 40°C for 5 min. Then add the corresponding alkylhalogenide (0.0044 Mol). Stir the reaction mixture at 40°C for 24 h and pour into water. Filter the precipitate formed, dry and recrystallize from EtOH.

Method B: Add while stirring the solution of compounds **3a-c** (0.0044 Mol) in ethanol (5 ml) to 0.2 g (0.0057 Mol) of the solution of sodium hydroxide in ethanol (3 ml). Then add the corresponding alkylhalogenide (0.0044 Mol) and reflux at 70°C for 30 min. Cool the reaction mixture, filter the precipitate formed, dry and recrystallize from CH₃CN.

The general procedure of alkylation of compounds 4a-b: Add while stirring the solution of compounds **4a-c** (0.0044 Mol) in ethanol (5 ml) to the solution of sodium hydroxide (0.0057 Mol) in ethanol (3 ml). Then add the corresponding alkylhalogenide (0.0044 Mol) and reflux at 70°C for 30 min. Cool the reaction mixture, filter the precipitate formed, dry and recrystallize from CH₃CN.

Biological Assay

Antimicrobial and antifungal test

1) Stiff plate agar diffusion method. The study of the antimicrobial and antifungal activity of the compounds synthesized was carried out using the stiff plate agar diffusion method against *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteum*, *C. tenuis* and *A. niger* [6]. The amount of

microbial cells was 109 c.f.u./mL. The incubation period for bacteria was 24 h at 35°C, for fungi – 48-72 h at 28-30°C. Antibiotics vancomycin, oxacillin, nystatin were used as standards. The bacterial cultures, standards and the substances obtained were applied across grooves in the concentration of 5 mg/mL, and then allowed to diffuse in the agar nutrient plate. The antimicrobial effect and the degree of activity of the compounds tested were evaluated by measuring of diameters of the inhibition zones (insensitive: 11-15 mm; sensitive: 16-25 mm; highly sensitive >25 mm). All experiments were repeated three times.

2) Serial dilution method. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined using serial dilutions in the liquid nutrient medium by the classical method [7]. Inoculations were made in the meat infusion broth at pH 7.0 for bacteria or in the wort agar for fungi with different concentrations of the compounds tested. The amount of microbial cells was 109 c.f.u./mL.

Results were calculated after storing the control and test tubes for 24-72 h (at 37°C for bacteria and at 30°C for fungi) by determining the presence or absence of microbial growth in the medium containing various dilutions of the compound tested. The last tube with growth inhibition (transparent broth) was considered to be the MIC of the compound against the given strain.

In the test tubes 0.02 mL of the transparent medium was inoculated in the sterilized meat infusion broth (for bacteria) or the wort agar (for fungi) in a stiff plate. The incubation period for bacteria was 24 h at 35°C, for fungi – 48-72 h at 28-30°C. The minimal

bactericidal concentration (MBC) and the minimal fungicidal concentration (MFC) were calculated by the absence of the colony growth. All experiments were repeated three times.

Conclusions

The aim of the present study was to synthesize and investigate the antibacterial and antifungal activities of some new thienopyrimidine derivatives. The starting material 1 (R_1, R_2 -thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-one) was used to synthesize the corresponding thiones and selenones. The reaction of alkylation of the compounds obtained was studied. In the case of thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-ones the products of N-alkylation were obtained. When thieno[2,3-*d*]pyrimidine-4(3*H*)-thio(seleno)nes were alkylated, S- and Se- derivatives were obtained. Changing of the reaction conditions did not lead to N-alkylated products as it was expected.

The antibacterial and antifungal activities of the compounds obtained in vitro have been screened using the stiff plate agar diffusion method and the serial dilution method. According to the stiff plate agar diffusion method compounds **4a** and **4c** have revealed a significant activity against *Escherichia coli*, *S. aureus*, and *M. luteum* appeared to be the most sensitive to compound 10a in the concentration of 0.5%, it has also been confirmed by the serial dilution method (MIC = 31.2 µg/mL; MBC = 125 µg/mL for *M. luteum*). The best fungistatic indicators against *A. niger* have been found for compounds **4a** and **9a** (MIC = 31.2 µg/mL).

References

1. Suresh M., Kumar A. S., Gorle S. *Letters in Drug Design and Discover*, 2013, Vol. 10, No.2. pp.186.
2. Sleeb B. E., Nikolakopoulos G., Street I. P. *Bioorg. and Med. Chem. Letters*, 2011, Vol. 21, No.19, pp.5992.
3. Khulud M., Al-Taisan, Hassan M., Al-Hazimi A., Shihry S. S. *Molecules*, 2010, Vol. 15, pp.3932.
4. Romashov L. V., Zeifman A. A., Zakharenko A. I., Novikov F. N., Stroilov V. S. *Mendeleev Commun.*, 2012, Vol. 22, pp.15.
5. Nirogi R. V. S., Kambhampati R. S., Kothmirkar P., Arepalli S., Pamuleti N. R. G., Shinde A. K., Dubey P. K. *Synth. Commun.*, 2011, Vol. 41, pp.2835.
6. Miyashita A., Fujimoto K., Okada T., Higashino T. *Heterocycle*, 1999, Vol. 42, pp.691.
7. Talukdar P. B., Sengupta S. K., Datta A. K. *Indian J. Chem.*, 1981, Vol. 20, No.7, pp.538-542.
8. Perrissin M., Favre M., Luu-Duc C., Bakri-Logeais F., Narcisse G. *Eur. J. Med. Chem.*, 1984, Vol. 19, No.5, pp.420-424.

Надійшла до редакції 05.11.2015 р.

UDC 615.212:542.951.1:547.831.7:547.831.9

THE STUDY OF REGULARITIES OF THE STRUCTURE – ANALGESIC ACTIVITY RELATIONSHIP IN A SERIES OF 4-HYDROXY-N-(PYRIDIN-2-YL)-2,2-DIOXO-1H-2λ⁶,1-BENZOTHIAZINE-3-CARBOXAMIDES

I.V.Ukrainets, L.O.Petrushova, O.V.Gorokhova, O.O.Davydenko*

National University of Pharmacy

53, Pushkinska Str., Kharkiv, 61002, Ukraine. E-mail: uiv-2@mail.ru

* N.I.Pirogov Vinnitsa National Medical University

Key words: amidation; 2-aminopyridines; 4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides; synthesis; analgesic activity

Continuing the search for new analgesics and with the purpose of revealing the structural-biological regularities, which are important for further studies, the synthesis of a series of 4-hydroxy-N-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides unsubstituted in position 1 has been carried out. The structure of all compounds synthesized has been confirmed by elemental analysis, ¹H NMR spectra and mass spectra. Based on a detailed analysis of the mass spectra it has been concluded that 4-hydroxy-N-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides in crystals are inner salts – 3-[[pyridinium-2-yl]amino]carbonyl-2,2-dioxo-1H-2,1-benzothiazin-4-olates. It has been noted that spectroscopy of ¹H NMR does not allow either to confirm or disprove that in DMSO solution the substances studied exist in the form of inner salts since the signals of the active protons of OH and NH-groups that are important do not appear. According to the results of the pharmacological screening the substances – for example, 3-[[6-methylpyridinium-2-yl]amino]carbonyl-2,2-dioxo-1H-2,1-benzothiazin-4-olate – exceeding Piroxicam by the analgesic activity have been found. It has been unequivocally determined that removal of the 1-N-methyl group from the structure of 4-hydroxy-1-methyl-N-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides in general leads to a marked decrease in analgesic properties and may be considered inappropriate.

ВИВЧЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ ЗВ'ЯЗКУ СТРУКТУРА – АНАЛГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ У СЕРІЇ 4-ГІДРОКСИ-N-(ПІРИДИН-2-ІЛ)-2,2-ДІОКСО-1H-2λ⁶,1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОКСАМІДІВ

I.V.Українець, Л.О.Петрушова, О.В.Горохова, О.О.Давиденко

Ключові слова: амідування; 2-амінопіридини; 4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміди; синтез; анальгетична активність

Продовжуючи пошук нових анальгетиків та з метою виявлення важливих для подальших досліджень структурно-біологічних закономірностей, ми здійснили синтез серії незаміщених у положенні 1 4-гідрокси-N-(піридин-2-іл)-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів. Будову усіх синтезованих речовин підтверджено даними елементного аналізу, спектрами ¹H ЯМР та мас-спектрами. На підставі детального аналізу мас-спектрів зроблено висновок, що в кристалах 4-гідрокси-N-(піридин-2-іл)-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміди представляють собою внутрішні солі – 3-[[піридиніум-2-іл]аміно]карбоніл-2,2-діоксо-1H-2,1-бензотіазин-4-олати. Зазначено, що спектроскопія ¹H ЯМР не дозволяє ні підтвердити, ні спростувати те, що і в розчині ДМСО досліджувані речовини існують у вигляді внутрішніх солей, оскільки важливі для подібних віднесення сигнали активних протонів OH та NH-груп у спектрах не проявляються. За результатами фармакологічного скринінгу виявлені речовини, наприклад, 3-[[6-метилпіридиніум-2-іл]аміно]карбоніл-2,2-діоксо-1H-2,1-бензотіазин-4-олат, які перевищують за анальгетичною активністю Піроксикам. Однозначно встановлено, що видалення 1-N-метильної групи зі структури 4-гідрокси-1-метил-N-(піридин-2-іл)-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів у цілому призводить до помітного зниження анальгетичних властивостей і може бути визнане недоцільним.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СВЯЗИ СТРУКТУРА – АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В СЕРИИ 4-ГИДРОКСИ-N-(ПИРИДИН-2-ИЛ)-2,2-ДИОКСО-1H-2λ⁶,1-БЕНЗОТИАЗИН-3-КАРБОКСАМИДОВ

I.V.Українець, Л.А.Петрушова, О.В.Горохова, А.А.Давиденко

Ключевые слова: амидирование; 2-аминопиридини; 4-гидрокси-2,2-диоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміди; синтез; анальгетическая активность

Продолжая поиск новых анальгетиков и с целью выявления важных для последующих исследований структурно-биологических закономерностей, мы осуществили синтез серии незамещенных в положении 1. Строение всех синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа, спектрами ¹H ЯМР и масс-спектрами. На основании детального анализа масс-спектров сделан вывод, что в кристаллах 4-гидрокси-N-(пиридин-2-ил)-2,2-диоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміди представляют собой внутренние соли – 3-[[пиридиніум-2-ил]аміно]карбоніл-2,2-диоксо-1H-2,1-бензо-тіазин-4-олати. Отмечено, что спектроскопия ¹H ЯМР не позволяет ни подтвердить, ни опровергнуть то, что и в растворе ДМСО исследуемые соединения существуют в виде внутренних солей, поскольку важные для подобных отнесення сигналы активных протонов OH и NH-групп в спектрах не проявляются. По результатам фармакологического скрининга выявлены вещества, например, 3-[[6-метилпіридиніум-2-ил]аміно]карбоніл-2,2-диоксо-1H-2,1-бензотіазин-4-олат, которые превосходят по анальгетической активности Піроксикам. Однозначно установлено, что удаление 1-N-метильной группы из структуры 4-гидрокси-1-метил-N-(піридин-2-ил)-2,2-диоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідов в целом приводит к заметному снижению анальгетических свойств и может быть признано нецелесообразным.

By now a chemical modification (both reversible and irreversible) has become such a powerful tool for identification of promising compounds and optimization of lead compounds obtained earlier, and it is impossible to imagine practical work of medicinal chemists engaged in the search for new biologically active substances without it. Using these methodologies a variety of problems – pharmacological, pharmaceutical, technological, etc., – faced by researchers on the long and arduous road from substance to medication are being successfully solved [1-6]. Essentially, guided by these principles we have recently begun to study derivatives of 4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic acids. As one of the first objects of our research *N*-*R*-amides with the general formula **I** have been chosen. Being isomers of highly effective pain killers of oxicam series **II** (e.g., Piroxicam *R* = pyridin-2-yl or Meloxicam *R* = 5-methyl-1,3-thiazol-2-yl) [7], these compounds are of interest as potential new analgesics. Their main and, at first glance, a very simple structural difference – atoms of nitrogen and sulphur in the benzothiazine cycle changed places, thanks to it this methodology actually got the name of “flip-flop drugs” [8] – appeared to be quite difficult task for practical implementation. However, a solution was found among hetarylamides [9-10] and anilides [11-12] of 4-hydroxy-1-methyl-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic acid **I**, highly active analgesics were really found.

The next stage of our research was an obvious, easily done removal of the *N*-methyl substituent from the base molecule carried out on the example of the series of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides **3a-g**. The present work aims to clarify the impact of this transformation on the structure, physico-chemical and, most

importantly, the biological properties of the compounds of the series studied. It is clear that obtaining the target products only looks like *N*-demethylation. In reality, from the synthetic scheme the stage of alkylation of the initial methyl anthranilate **1** is simply excluded. Based on it, ethyl 4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylate (**2**) unsubstituted in position 1 was synthesized according to the method previously described [13]. The target amides **3a-g** were obtained with good yields by interaction of this ester with equimolar amounts of the corresponding 2-aminopyridines in boiling xylene.

After recrystallization from DMF amides **3a-g** synthesized are colourless or white with a yellowish tint crystalline substances with narrow intervals of melting points, when heating they are soluble in DMF and DMSO and insoluble in ethanol and water. To confirm their structure the elemental analysis, spectroscopy ¹H NMR, mass spectrometry were used, and in the case of 6-methylpyridine-2-ylamide **3d** the X-ray analysis was also applied. Unfortunately, the low solubility of all amides **3a-g** in DMSO-*d*₆ at room temperature did not allow to record ¹³C NMR spectra.

A distinctive feature of 1-*N*-methylsubstituted pyridine-2-ylamides with the general formula **I** is their existence in the form of inner salts (at least in the crystal phase) [10]. However, the question whether such a structure preserves in solution is still open. One fails to solve it in the case of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides **3a-g** as well. The ¹H NMR spectra give important and useful information about their structure. However, they do not allow either confirm or disprove that in DMSO solution the substances studied exist in the form of inner salts since the signals of the active protons OH and NH-groups that are important do not appear (obviously, due to the rapid deuterium exchange).

But in the gas phase the salt forms of amides **3a-g** are obviously preserved as evidenced by their mass spectrometric behaviour. Unlike existing conventional and therefore quite stable 4-OH forms of 4-hydroxy-1-methyl-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides [9], here by electron impact ionization the molecular ion peak was managed to be fixed in one case only and in extremely low intensity (see Scheme 2). And if the main pathway of

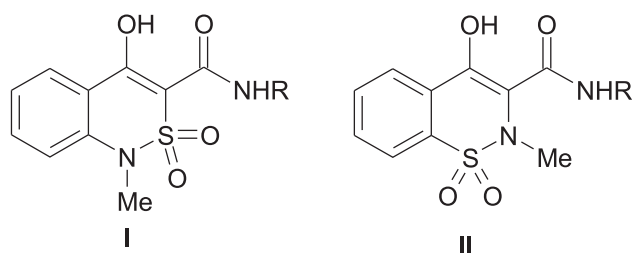
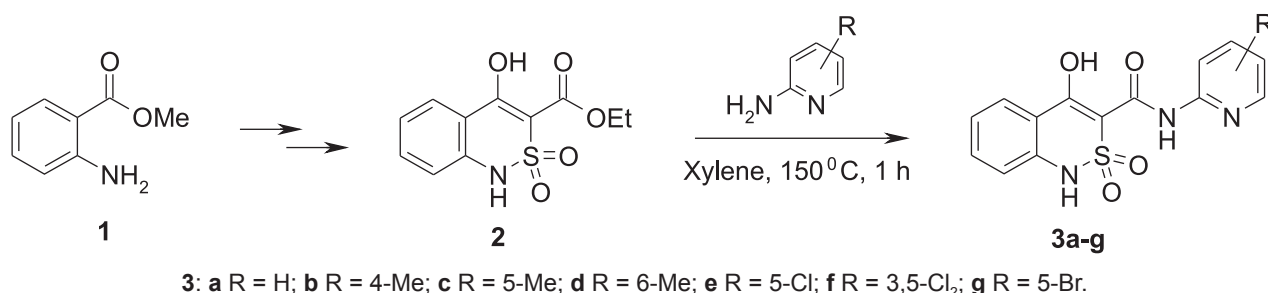
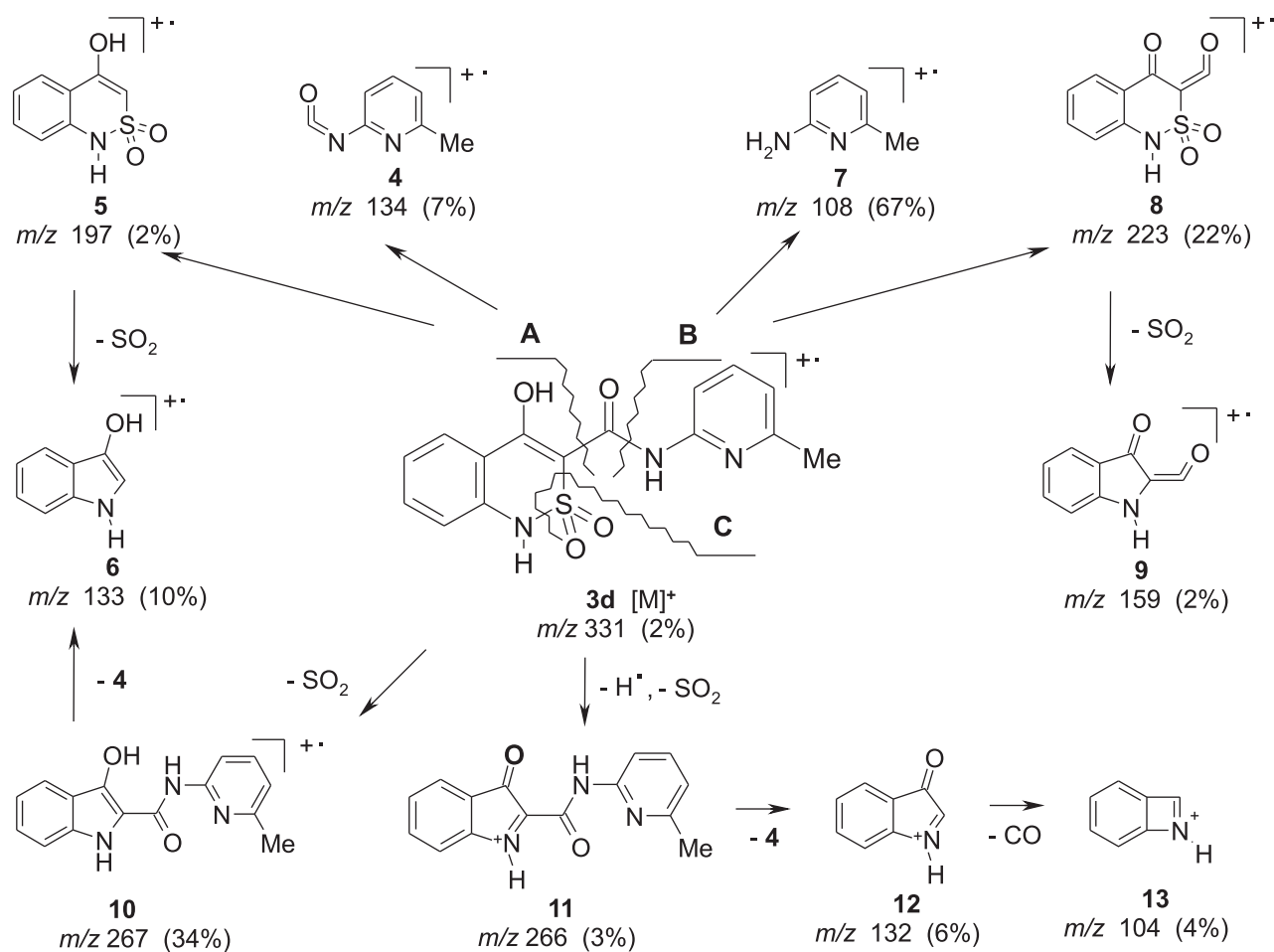


Fig. The general formula of “flip-flop” analgesics [3].



Scheme 1. The synthesis of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides **3**.

Scheme 2. The mass spectrometric fragmentation of amide **3d** molecular ion.

the primary decomposition of molecular radical cations of thiazolyl-2-amides was breaking of the bond of the benzothiazine-carbamide fragment (pathway A), but with transition to inner salts **3a-g** the probability of such direction is considerably lost. As a result, the intensity of peaks of the corresponding fragment ions of isocyanate **4**, benzothiazine **5** and hydroxyindole **6** does not exceed 2-7%. The primary destruction of the CO-NHHet bond (pathway B) comes to the fore, as a rule, it leads to appearance of high-intensity fragment ion peaks of the corresponding 2-aminopyridines **7**, as well as ketene **8** and oxindole **9** that are common to all samples under research. However, the main distinctive feature of the mass spectra of amides **3a-g** conditioned by their existence in the form of inner salts is an easy elimination of SO_2 from molecular ions (pathway C). It is of interest that in this case two types of products are formed: 3-hydroxyindole-2-carboxamide **10** (main) and its 3-oxo analogue **11** (minor). Apparently, their sources are different zwitterionic forms of amide **3d**.

The analgesic activity of the compounds synthesized was studied compared to Piroxicam being similar by its structure on the model of the thermal tail-flick procedure in white male rats weighing 180-200 g (Tail Immersion Test) [14]. For this purpose the rat's

tail tip was immersed in a water bath heated to 54°C , and the latent period of the tail withdrawal (immersion) expressed in seconds was determined. The analgesic effect (in %) was assessed by the change of the latent period in 1 h after introduction of the test substances and the reference drug. Seven experimental animals were involved to obtain statistically reliable results (the significance level of the confidence interval accepted in this work was $p \leq 0.05$) in testing each of amides **3a-g**, the reference drug and control. All substances under research and Piroxicam were introduced orally in the form of fine aqueous suspensions stabilized with Tween-80 in a screening dose of 20 mg/kg. The animals of the control group received an equivalent amount of water with Tween-80.

All biological experiments were carried out in full accordance with the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes and the Ukrainian Law No. 3447-IV "On protection of animals from severe treatment" (2006).

The results of our pharmacological experiments presented in Table show that removal of the 1-*N*-methyl group reflects ambiguously on the analgesic properties of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides. In some cases –

Table

Analgesic activities of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides (**3a-g**) and Piroxicam

Compound	R	The latent period in 1 h after introduction of the compounds, s	Change of the latent period compared to control, % ^a
3a	H	3.52±0.11	+ 12.0 (+ 5.8)
3b	4-Me	3.46±0.10	+ 10.1 (+ 42.3)
3c	5-Me	4.08±0.12 ^b	+ 29.9 (+ 3.6)
3d	6-Me	4.63±0.14 ^b	+ 47.6 (+ 76.2)
3e	5-Cl	3.61±0.10	+ 15.0 (+ 96.7)
3f	3,5-Cl ₂	3.92±0.11 ^b	+ 24.7 (+ 25.1)
3g	5-Br	4.25±0.16 ^b	+ 35.3 (+ 7.0)
Piroxicam		3.96 ± 0.15 ^b	+ 26.1
Control		3.14 ± 0.14	-

^a – The data on the analgesic activity of the corresponding 1-*N*-methyl-substituted 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides (**1**) are given in parentheses [10]; ^b – Significantly different from control, *p* ≤ 0.05

3a,f amides – such chemical modification has almost no effect on the biological properties, and in other cases – **3b,d,e** amides – it causes a significant decline. At the same time there are positive examples of a substantial increase in activity – **3c,g** amides significantly exceed not only their 1-*N*-methyl-substituted analogues, but Piroxicam as well by the level of the analgesic effect.

Experimental Part

¹H NMR spectra (400 MHz) were received on a Varian Mercury-400 instrument (USA) in DMSO-*d*₆ solution with TMS as an internal standard. The electron impact mass spectra were recorded on a Varian 1200L mass spectrometer (USA) with complete scanning in the *m/z* range from 35 to 700 and direct sample inlet. The electron impact ionization was at 70 eV. Elemental analysis was performed on a Euro Vector EA-3000 microanalyzer (Great Britain). Melting points were determined in a capillary using a Stuart SMP10 digital melting point apparatus (Great Britain). The starting ethyl 4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylate (**2**) was prepared by our previous procedure [13]. The commercially available *o*-xylene was dried over anhydrous granular CaCl₂ before use and distilled.

The general procedure for the synthesis of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides (3a-g**).** Keep the mixture of ethyl ester **2** (2.69 g, 0.01 Mol), the corresponding 2-aminopyridine (0.01 Mol), and dry *o*-xylene (5 mL) for 1 h at 150°C on a liquid metal bath using a suitable air-cooled distilling column that allows to distill off

the ethanol formed without removing the *o*-xylene solvent. Cool the reaction mixture, add EtOH (15 mL), and leave the mixture for several hours at room temperature. Filter the crystalline amide **3** precipitated, wash with cold EtOH, dry, and recrystallize from DMF. Pyridin-2-ylamides **3a-g** were colourless crystals or white crystals with a yellowish tint.

4-Hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (3a**).** Yield – 92%. M. p. – 271-272°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.23 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H-6'); 7.96-7.90 (m, 2H, H-4', 5), 7.70 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-3'); 7.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7), 7.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-5'), 7.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6), 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, H-8); MS, *m/z* (*I*_{rel}, %): 253 [M – SO₂]⁺ (15), 252 (2), 223 (3), 197 (5), 133 (14), 132 (6), 120 (2), 106 (100), 104 (39), 77 (87); Anal. Calcd. for C₁₄H₁₁N₃O₄S: C, 52.99; H, 3.49; N, 13.24; S, 10.10. Found: C, 53.06; H, 3.55; N, 13.17; S, 10.03.

4-Hydroxy-*N*-(4-methylpyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (3b**).** Yield – 90%. M. p. – 297-299°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.12 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-6'), 7.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.52-7.47 (m, 2H, H-7, 3'), 7.20-7.11 (m, 3H, H-6, 8, 5'), 2.35 (s, 3H, 4'-CH₃); MS, *m/z* (*I*_{rel}, %): 267 [M – SO₂]⁺ (17), 266 (3), 223 (30), 197 (12), 159 (5), 148 (13), 134 (29), 133 (12), 132 (14), 120 (33), 119 (95), 108 (100), 104 (62), 92 (81), 81 (36), 80 (57), 77 (53); Anal. Calcd. for C₁₅H₁₃N₃O₄S: C, 54.37; H, 3.95; N, 12.68; S, 9.68. Found: C, 54.43; H, 4.02; N, 12.62; S, 9.59.

4-Hydroxy-*N*-(5-methylpyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (3c**).** Yield – 91%. M. p. – 290-292°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.16 (s, 1H, H-6'), 7.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-5), 7.88-7.75 (m, 2H, H-4', 3'), 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.21-7.08 (m, 2H, H-6, 8), 2.35 (s, 3H, 5'-CH₃); MS, *m/z* (*I*_{rel}, %): 267 [M – SO₂]⁺ (49), 266 (7), 223 (2), 197 (3), 159 (3), 148 (17), 134 (10), 133 (16), 132 (8), 120 (32), 108 (100), 104 (18), 92 (47), 81 (25), 80 (40), 77 (22); Anal. Calcd. for C₁₅H₁₃N₃O₄S: C, 54.37; H, 3.95; N, 12.68; S, 9.68. Found: C, 54.44; H, 4.01; N, 12.60; S, 9.62.

4-Hydroxy-*N*-(6-methylpyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (3d**).** Yield – 95%. M. p. – 266-268°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.02-7.85 (m, 3H, H-5, 4', 3'), 7.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-7), 7.27-7.04 (m, 3H, H-6, 8, 5'), 2.50 (s, 3H, 6'-CH₃ coincides with the signals of the residual protons in DMSO-*d*₆); MS, *m/z* (*I*_{rel}, %): 331 [M]⁺ (2), 267 [M – SO₂]⁺ (34), 266 (3), 223 (22), 197 (2), 159 (2), 148 (39), 134 (7), 133 (10), 132 (6), 120 (100), 108 (67), 104 (4), 92 (84), 91 (62), 81 (88), 80 (58), 77 (17); Anal. Calcd. for C₁₅H₁₃N₃O₄S: C, 54.37; H, 3.95; N, 12.68; S, 9.68. Found: C, 54.40; H, 4.00; N, 12.59; S, 9.61.

***N*-(5-Chloropyridin-2-yl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (**3e**).** Yield – 93%. M. p. – 285-287°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.35

(s, 1H, H-6'), 8.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-4'), 8.00 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-5), 7.90 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-3'), 7.63 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.27 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-6), 7.20 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8); MS, m/z (I_{rel} , %): 287/289 [M - SO₂]⁺ (34/14), 286/288 (5/7), 197 (24), 159 (6), 154/156 (48/13), 133 (22), 132 (12), 128/130 (97/43), 119 (59), 104 (70), 101 (100), 92 (58), 91 (19), 77 (79); Anal. Calcd. for C₁₄H₁₀ClN₃O₄S: C, 47.80; H, 2.87; N, 11.95; S, 9.12. Found: C, 47.74; H, 2.80; N, 11.88; S, 9.04.

***N*-(3,5-Dichloropyridin-2-yl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (3f).**

Yield – 86%. M. p. – 256-258°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.43 (s, 1H, H-6'), 8.20 (s, 1H, H-4'), 7.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-5), 7.60 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.24 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-6), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-8); MS, m/z (I_{rel} , %): 312/323/325 [M - SO₂]⁺ (14/10/2), 197 (18), 188/190/192 (36/24/4), 162/164/166 (98/74/14), 159 (7), 133 (15), 132 (4), 127 (60), 104 (45), 92 (61), 91 (24), 77 (38), 73 (63), 64 (100); Anal. Calcd. for C₁₄H₉Cl₂N₃O₄S: C, 43.54; H, 2.35; N, 10.88; S, 8.30. Found: C, 43.46; H, 2.41; N, 10.96; S, 8.23.

***N*-(5-Bromopyridin-2-yl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide (3g).**

Yield – 92%. M. p. – 291-292°C (decomp.); ¹H NMR, δ: 8.41 (s, 1H, H-6'), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-4'), 8.03-7.96 (m, 2H, H-5, 3'), 7.61 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-7), 7.25 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-6), 7.19 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8); MS, m/z (I_{rel} , %): 331/333 [M - SO₂]⁺ (46/45), 223 (3), 198/200 (30/27), 197 (19), 172/174 (65/61), 159 (12), 145/147 (48/44), 133 (33), 132 (18), 119 (87), 104 (76), 92 (93), 91 (31), 77 (100), 64 (44); Anal. Calcd. for C₁₄H₁₀BrN₃O₄S: C, 42.44; H, 2.54; N, 10.61; S, 8.09. Found: C, 42.49; H, 2.61; N, 10.68; S, 8.01.

Conclusions

1. The article presents a new series of 4-hydroxy-*N*-(pyridin-2-yl)-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides without substituents at the nitrogen atom of the benzothiazine cycle. The analgesic properties of all substances synthesized have been studied.

2. It has been observed that position 1 readily subjected to modification can be used for purposeful improvement of pharmaceutical or pharmacological properties of *N*-substituted 4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides.

References

1. Kubinyi H. Rossiiskii Khimicheskii Zhurnal – Russian Chemical Journal, 2006, Vol. L, No.2, pp.5-17. <http://www.chem.msu.ru/rus/journals/jvho/2006-2/5.pdf>
2. Goodman A., McCall J. R., Jacocks H. M., Thompson A., Baden D., Abraham W. M., Bourdelais A. Marine drugs, 2014, Vol. 12, No.4, pp.1839-1858. DOI: 10.3390/md12041839.
3. Monroy C. A., Doorn J. A., Roman D. L. Chemical research in toxicology, 2013, Vol. 26, No.12, pp.1832-1839. DOI: 10.1021/tx400212q.
4. Banerjee S. K., Pogolotti A. Jr, Rupley J. A. The Journal of biological chemistry, 1975, Vol. 250, No.20, pp.8260-8266.
5. Rowland G. W., Schwartz G. G., John E. M., Ingles S. A. Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012, Vol. 27, No.1, pp.187-194. DOI: 10.1002/jbmr.505.
6. Riverol M., Ordóñez C., Collantes M., DiCaudo C., Peñuelas I., Arbizu J., Marcilla I., Luquin M. R. Neurobiology of disease, 2014, Vol. 62, pp.250-259. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.09.014.
7. Kleemann A., Engel J., Kutscher B., Reichert D. Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications of the most relevant APIs, 5th ed. Stuttgart, Thieme; 2008, 1800 p.
8. Ukrainets I. V., Gorokhova O. V., Nidal Amin Jaradat, Petrushova L. A., Mospanova E. V., Savchenkova L. V., Kuz'min V. E., Lyahovsky A. V. 4-Hydroxyquinolin-2-ones and their Close Structural Analogues as a New Source of Highly Effective Pain-killers. In book: Pain and Treatment, Racz G. B. and Noe C. E. (Ed.), Rijeka: InTech, 2014, pp.21-73. DOI: 10.5772/57402. <http://www.intechopen.com/articles/show/title/4-hydroxyquinolin-2-ones-and-their-close-structural-analogues-as-a-new-source-of-highly-effective-pa>
9. Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P., Sim G. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2014, Vol. 50, No.1, pp.103-110. doi:10.1007/s10593-014-1452-0.
10. Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P., Liu Yangyang. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2014, Vol. 50, No.4, pp.564-572. DOI:10.1007/s10593-014-1508-1.
11. Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P. Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2014, Vol. 12, No.2(47), pp.53-58.
12. Petrushova L. A., Ukrainets I. V., Dzyubenko S. P., Grinevich L. A. Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2015, Vol. 13, No.1(50), pp.44-48.
13. Ukrainets I. V., Petrushova L. A., Dzyubenko S. P. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2013, Vol. 49, No.9, pp.1378-1383. DOI:10.1007/s10593-013-1388-9.
14. Vogel H. G. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. – Berlin, Springer; 2008, pp.1014-1016.

Надійшла до редакції 15.10.2015 р.

THE COMPLEXING ABILITY OF N-SUBSTITUTED THIOUREA DERIVATIVES AS CHELATING LIGANDS IN THE REACTION WITH PdCl₂

Yu.L.Zborovskii¹, V.V.Orysyk¹, D.O.Melnychenko¹, S.I.Orysyk², H.H.Repich²,
L.V.Garmanchuk³, L.I.Palchykovska⁴, V.I.Pekhnyo², M.V.Vovk¹

¹ Institute of Organic Chemistry NAS of Ukraine,
5, Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine. E-mail: zborovsky@ioch.kiev.ua

² V.I.Vernadskii Institute of General and Inorganic Chemistry NAS of Ukraine

³ Educational and Scientific Centre "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University of Kyiv

⁴ Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

Key words: C=C double bond; palladium coordination compounds; thioureas; single crystal X-ray diffraction study; π -complexes; antitumor activity

The complexation reactions of N-substituted thiourea derivatives with PdCl₂ have been investigated in the present work. The functionally substituted thiourea derivatives are found to be effective chelating agents, in which the nature of substituents has a significant impact to the compositions and structures of complexes. Thus, (N-pyridine-2-yl)thioureas in the interaction with PdCl₂ form two types of complexes in the molar ratio of M:L 1:1 and 1:2, in which they act as S,N-bidentate ligands coordinated to the palladium ion by thione sulphur and the nitrogen atom of the pyridine ring. The reaction of N-allylthioureas with PdCl₂ in the equimolar ratio results in formation of the π -complexes where the ligands are coordinated by the thione sulphur and the C=C double bond of the allylic moiety. The preparative methods for the synthesis of this type of complexes have been developed. The composition of the products synthesized and the ligands coordination mode have been determined by elemental analysis and ¹H NMR spectroscopy. Furthermore, the structure of compounds 4, 5 has been confirmed by the X-ray diffraction study. The biomedical studies have proven that the complex compounds 5 and 6 *in vitro* have the cytostatic and cytotoxic activity against tumour HeLa cells.

КОМПЛЕКСООТВОРЮВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ N-ЗАМІЩЕНИХ ПОХІДНИХ ТІОСЕЧОВИНИ ЯК ХЕЛАТУЮЧИХ ЛІГАНДІВ У РЕАКЦІЇ З Pd(II)

Ю.Л.Зборовський, В.В.Орисук, Д.О.Мельниченко, С.І.Орисук, Г.Г.Репіч, Л.В.Гарманчук, Л.І.Пальчиковська, В.І.Пехньо, М.В.Вовк

Ключові слова: С=C подвійний зв'язок; координаційні сполуки паладію; тіосечовина; рентгеноструктурний аналіз; π -комплекс; протипухлинна активність

Досліджені реакції комплексоутворення N-заміщених похідних тіосечовини з PdCl₂. Встановлено, що функціонально заміщені похідні тіосечовини є ефективними хелатуючими агентами, при цьому природа замісників суттєво впливає на склад і будову комплексних сполук. Так, (N-піридин-2-іл)тіосечовини при взаємодії з PdCl₂ утворюють два типи комплексів у співвідношенні M:L 1:1 та 1:2, до складу яких ці реагенти входять як S,N-донорні бідентатні ліганди, координуючись до іона паладію атомом сірки тіонної групи та атомом азоту піридинового ядра. Реакція N-алілтїосечовин із PdCl₂ при еквімолярному співвідношенні реагентів приводить до утворення π -комплексів, в яких координація здійснюється за участю атома сірки тіонної групи та С=C подвійного зв'язку алільного фрагмента. Розроблені препаративні методи синтезу такого типу комплексних сполук. Склад синтезованих речовин та спосіб координації лігандів встановлені методами елементного аналізу та ¹H ЯМР спектроскопії. Окрім того, будова комплексів 4, 5 доведена рентгеноструктурним методом. Медико-біологічними дослідженнями встановлено, що комплексні сполуки 5 і 6 *in vitro* проявляють цитостатичну та цитотоксичну дію на пухлинні клітини лінії HeLa.

КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ N-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОМОЧЕВИНЫ КАК ХЕЛАТИРУЮЩИХ ЛИГАНДОВ В РЕАКЦИИ С Pd(II)

Ю.Л.Зборовский, В.В.Орысык, Д.А.Мельниченко, С.И.Орысык, Г.Г.Репич, Л.В.Гарманчук, Л.И.Пальчиковская, В.И.Пехньо, М.В.Вовк

Ключевые слова: С=C двойная связь; координационные соединения палладия; тиомочевина; рентгеноструктурный анализ; π -комплексы; противоопухолевая активность

Исследованы реакции комплексообразования N-замещенных производных тиомочевин с PdCl₂. Установлено, что функционально замещенные производные тиомочевин являются эффективными хелатирующими агентами, при этом природа заместителей существенно влияет на состав и строение комплексных соединений. Так, (N-пиридин-2-ил)тиомочевин при взаимодействии с PdCl₂ образуют два типа комплексов в соотношении M:L 1:1 и 1:2, в состав которых эти реагенты входят как S,N-донорные бидентатные лиганды, координируясь к иону палладия атомом серы тионной группы и атомом азота пиридинового ядра. Реакция N-аллилтиомочевин с PdCl₂ при эквимолярном соотношении реагентов приводит к образованию π -комплексов, в которых координация осуществляется с участием атома серы тионной группы и С=C двойной связи аллильного фрагмента. Разработаны препаративные методы синтеза этого типа комплексных соединений. Состав синтезированных веществ и способ координации лигандов установлены элементарным анализом и методом ¹H ЯМР спектроскопии. Кроме того, строение комплексов 4, 5 доказано рентгеноструктурным методом. Медико-биологическими исследованиями установлено, что комплексные соединения 5 и 6 *in vitro* оказывают цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки линии HeLa.

Thiourea and its N-substituted derivatives are efficient complexing agents for metal ions, which are widely used as ligands in coordination chemistry [1-3]. The presence of unshared electron pairs in the sulphur atom and two nitrogen atoms allows to form the complex compounds with transition metal salts of the different type, many of which possess valuable applied properties (optical, semiconductor, biological, etc.) and are employed in various fields of science and technology [4-7]. Thioureas are of prime importance as anticancer drugs due to their ability to inhibit the enzymes that are involved in the malignant tumour formation processes (tyrosine kinase, protein tyrosine kinase and NADH oxidase) [8-10].

In recent 15-20 years much attention has been given to the study of the biological activity of complex compounds of transition and platinum metals [11-15]. Many of them exhibit a high pharmacological activity, and as therapeutic agents are often superior to starting metal salts because the complex formation prevents hydrolysis in the physiologic medium, reduces toxicity and facilitates penetration of medicines through the cell membrane. Moreover, the use of biologically active ligands, an additive or synergistic effect manifests itself between the constituents of complexes [16, 17]. Therefore, development of methods for the synthesis of different types of complexes based on thiourea derivatives is a promi-

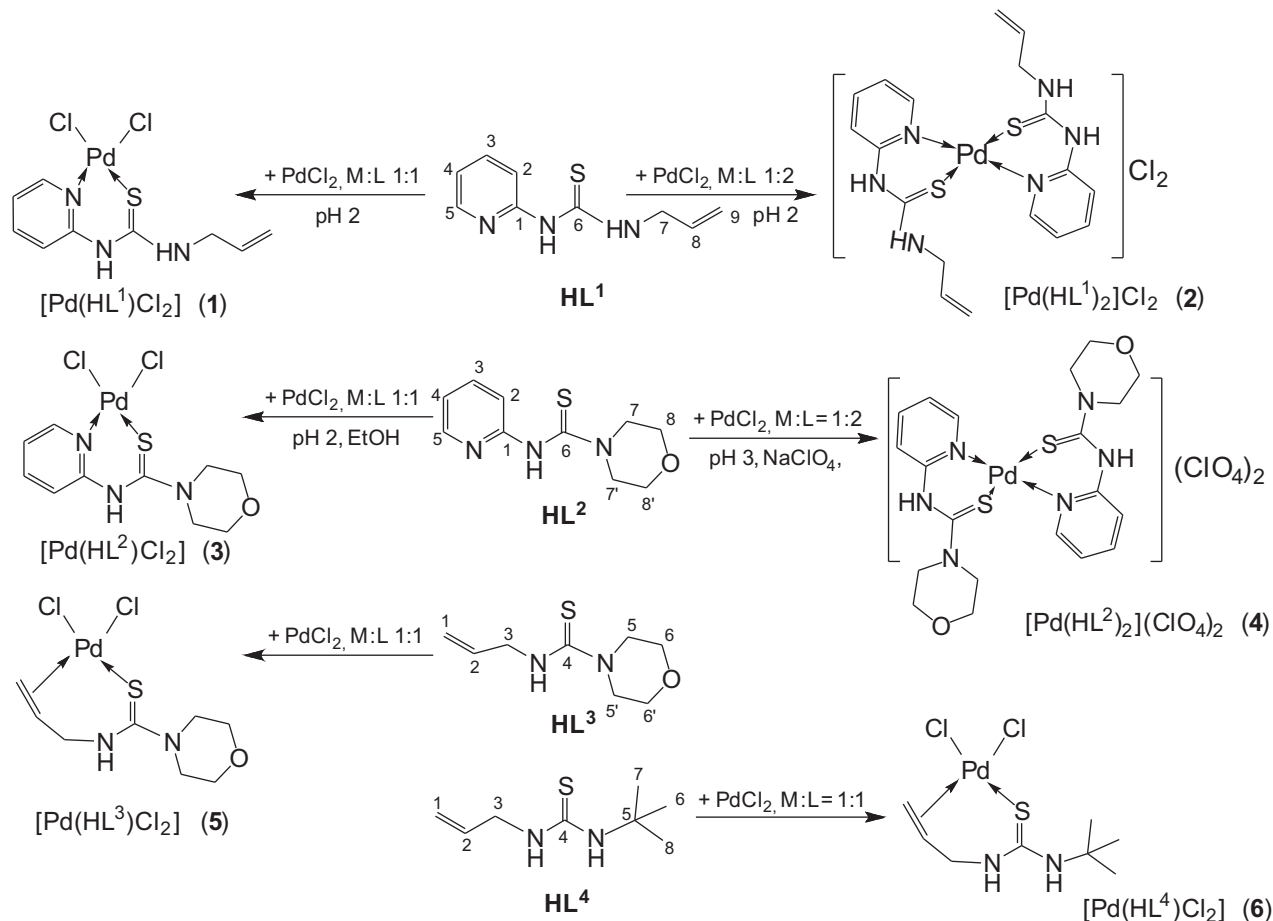
sing trend in creating novel therapeutic and diagnostic agents [3, 18-21].

The introduction of additional functional groups into the structure of thioureas (such as allyl, pyridine, morpholine) allows to expand the range of their biological activity and to increase the denticity of these ligand systems, it leads to their competitive coordination to metal ions. On the other hand, palladium as a "soft Lewis acid" has also the competing ability in the interaction with ambidentate ligands by the «soft-soft» type thereby resulting in formation of complexes with different structures depending on the synthetic conditions and the geometrical arrangement of donor atoms in the ligands.

In this work, the effect of synthetic conditions and the denticity of *N*-allyl-*N'*-(2-pyridinyl)thiourea (**HL¹**), *N*-allylmorpholine-4-carbothioamide (**HL³**) and *N*-allyl-*N'*-*tert*-butylthiourea (**HL⁴**) as ligands on form *N*-(2-pyridinyl)morpholine-4-carbothioamide (**HL²**), ation of mononuclear coordination compounds with PdCl₂ has been studied. In addition, the cytotoxic and proapoptotic activities of Pd(II) complexes based on **HL^{3,4}** (**5**, **6**) were determined.

Results and Discussion

The complexation reactions were carried out in the acidic medium according to the Scheme. Thioureas (**HL¹**, **HL²**) contain nucleophilic pyridine nitro-



Scheme. The schematic synthesis of complexes 1-6.

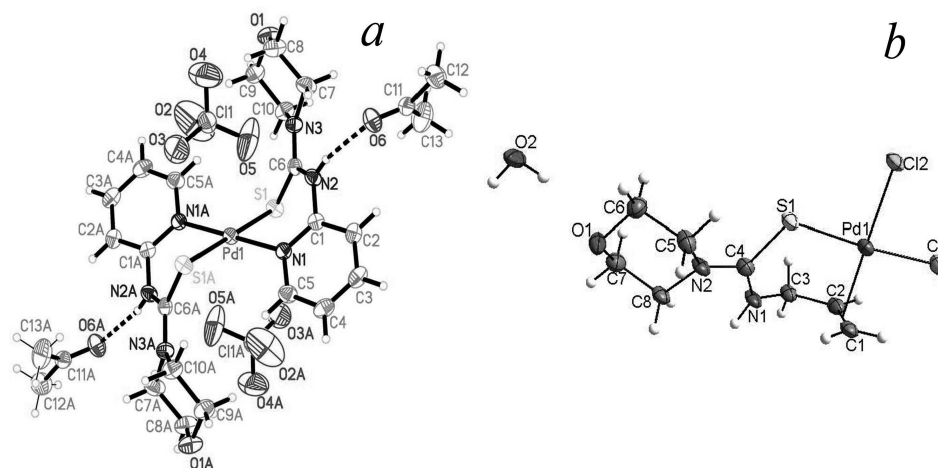


Fig. The molecular structure of complexes **4** (a) and **5** (b).

gen and sulphur atoms of the carbothioamide group at the stoichiometrically advantageous positions for formation of metalochelates; it results in their coordination to the central metal ion as S,N-bidentate ligands thereby forming complexes **1-4**. At the same time the acid medium contributes to their stay in thionic tautomeric form. Changing the reaction conditions such as temperature, the heating time and the molar ratio affect the number of coordinated ligand molecules and chlorine anions.

Unlike **HL**¹, **HL**², thioureas **HL**³, **HL**⁴ contain only one nucleophilic atom (sulphur) capable to coordination, which makes them potential monodentate reagents. However, the ability of palladium to the “soft-soft” interaction leads to formation of n,π -chelate complexes **5**, **6**. All attempts to synthesize complexes with the molar ratio of 1:2 under the same conditions were unsuccessful. It may be due to the antisymbiosis effect of “soft” allyl and thiourea groups, which makes unfavourable further substitution of “hard” Cl⁻ ions to “soft” donor atoms of another ligand molecule [22].

All the complexes are soluble in DMSO and DMF, whereas complexes **2**, **4-6** are also soluble in water and alcohols.

Single crystal X-ray diffraction study of complexes 4, 5. One molecule of complex **4** per unit cell is observed, and the atom Pd1 occupies a special position at the centre of inversion. The palladium atom is bound by two S and two N atoms with bond angles N1a–Pd1–N1 180.0°, S1a–Pd1–S1 180.0°, N1a–Pd1–S1a 85.74(7)° and N1a–Pd1–S1 94.26(7)° in a square-planar coordination geometry (Fig. a). The Pd1–S1 and Pd1–N1 bond lengths are 2.315(8) and 2.029(2) Å, respectively. The bonding parameters agree with the coordinate patterns in [23–25].

The fragment N2C6N3 has a planar configuration (the sum of bond angles is 360°) and C6–N2 and C6–N3 bond lengths are shorter than that for a standard single C–N bond because of conjugation of the lone pair electrons for the nitrogen atoms N2 and N3 with the double C(6)=S(1) bond (1.731(3) Å). The

pyridine ring is planar: the mean deviation from the least-square plane does not exceed 0.011 Å. The bond angles Pd1–S1–C6 92.98(10)°, S1–C6–N2 120.1(2)°, C6–N2–C1 127.4(3)°, N2–C1–N1 120.2(3)°, C1–N1–Pd1 123.13(18)°, N1–Pd1–S1 85.74(7)° of the six member chelate ring is similar to the corresponding angles in [24] and illustrate that the metalocycle is significantly distorted and has a bath form. The symmetric cycle Pd1/S1a/C6a/N2a/C1a/N1a is analogous. The asymmetric unit also contains a solvate molecule of acetone, which is bonded to the complex by the N2–HNH...O6 hydrogen bond, with the following parameters: N2...H2N, 0.73(3); HNH...O6, 2.15(3); N2H...O6, 2.864(4) Å; N2–H2N–O6 166(3)°. Two perchlorate anions occupy the free space around the palladium atom, and the shortest Pd1–O2 distance of the perchlorate anion is 3.747 Å.

The asymmetric unit of compound **5** involves one solvation water molecule (Fig. b). The central palladium ion forms a square planar coordination unit Pd(C=C)S1Cl₂ by atom S1, two chloride ions Cl1, Cl2 and double bond C1=C2 of the allyl fragment. The midpoint of the C1=C2 double bond is considered as the point ligand with the distance of 2.0451(3) Å to the central metal ion. The average deviation from the absolute planar configuration is 0.0325 Å. The angle between the polyhedral plane and C1–C2 bond is 179°. The bond length C4–S1 (1.741(4) Å) indicates to the thione tautomeric form of the coordinated thiourea **HL**³. The bonds Pd–Cl (2.322, 2.329 Å) in complex **5** are equivalent. The analysis of the crystal packing shows a layered structure of complex molecules along the crystallographic axis [010] by the “head-to-tail” type with the extensive system of hydrogen bonds O–H...O 2.897(4) Å, N–H...O 2.759(4) Å and O–H...Cl 3.278(3), 3.350(3) Å.

¹H NMR spectra. In the ¹H NMR spectra of complexes **1**, **2**, the signals for CH=CH₂ (allyl) and N²H (thiourea group) are shifted upfield by $\Delta\delta = 0.104$ – 0.135 and 1.239 ppm, respectively, compared to those in the spectrum of **HL**¹. The considerable upfield shift

Table

The cytostatic/cytotoxic activity of complex compounds 5, 6

Compound	IC ₅₀ , M	Apoptotic level, %	Cell cycle phases (%), (C _{complex} = IC ₅₀ /10)		
			G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
Control	–	11.8	43.45±1.30	22.28±1.40	34.26±1.80
Complex 5	1.5·10 ⁻⁴	80.7	67.40±1.12	6.67±0.41	25.93±1.29
Complex 6	2·10 ⁻⁶	31.3	48.85±0.22	29.51±1.14	21.64±1.13

of the signal for N²H is due to its participation in forming the six-membered chelate ring Pd-N¹-C¹-N²H-C⁶-S (Scheme). The fairly substantial downfield shifts of the signals for the pyridine protons can also be attributed to the coordination of **HL**¹ by the pyridine N atom. It should be noted that the protons C⁵H_{py} ($\Delta\delta=0.766$), C²H_{py} ($\Delta\delta=0.296$), C³H_{py} ($\Delta\delta=0.266$) and C⁴H_{py} ($\Delta\delta=0.192$ ppm), which are in *ortho* and *para* position to the coordination bond (N_{py}→Pd) are most sensitive to the complexation. This is in full agreement with the current approach to location of the coordination bond using the heteronuclear NMR method [26].

The ¹H NMR spectrum of the **HL**² shows the signals at 7.05, 7.60, 7.70 and 8.28 ppm, which are assigned to the pyridine ring protons. A broad singlet corresponding to one proton at 9.85 ppm is assigned to the NH group. The morpholine protons give two triplets at 3.64 and 3.89 ppm, which correspond to -N-CH₂ and -O-CH₂ groups, respectively.

In the spectra of complexes **3**, **4** all multiplets of the pyridine ring are shifted downfield and observed at 7.42-8.97 ppm, wherein the doublet H⁵ located near the nitrogen atom undergoes significantly more downfield shift ($\Delta\delta=0.69$ ppm); it indicates the participation of the pyridine ring in the coordination to the metal ion. The N²H group is included in the six membered metalocycle, and it causes a significant downfield shift of a broad singlet of this proton by 1.56/1.53 ppm and indicates inclusion of the carbothioamide group in the coordination to the metal. The morpholine proton signals are observed at 3.77/3.75 (-N-CH₂) and 4.03/4.00 ppm (-O-CH₂).

The comparison of the ¹H NMR spectra of thioureas HL₃, HL₄ and complexes 5, 6 shows that the proton signals of NH (the thioureate group) and =C2Hallyl by $\Delta\delta=+1.289/+1.648$, $+0.301/+0.332$ ppm undergo the most significant downfield shifts while the multiplet of the allyl fragment =C1H2 is significant upfield by -0.544/-0.824 ppm. The most characteristic for the ¹H NMR spectra of these complexes is splitting of the C3H2 signal to the two doublets.

Cytostatic/cytotoxic screening of complex compounds 5, 6. Being the structural analogues of cisplatin the complex compounds **5**, **6** were tested in the MTT-assay and possessed the cytostatic/cytotoxic activity with IC₅₀ index of 10⁻⁶-10⁻⁴ M, (Table) compared to cisplatin IC₅₀=1.3·10⁻⁵ M index for HeLa cells [27].

The highest index IC₅₀ (1.5·10⁻⁴ M) was determined for the palladium complex with **HL**³ (**5**). Both compounds studied had the proapoptotic effect, but in contrast to the highest IC₅₀ index, cytostatic and proapoptotic effects for complex compound **5** were more pronounced. For complexes **5**, **6** the apoptotic indexes exceeded the control rate sevenfold and 2.5 times, respectively.

Both compounds possessed the cytostatic and antisynthetic effect. The highest inhibition of cells in both synthetic and mitotic phases (G₂/M) was found for compound **5**: the growth of the cell subpopulation in the G₁/G₀-phase (1.5 times) was accompanied with reduction of the cell subpopulation in synthetic (1.3 times) and G₂/M phases (in 3.3 times). The effect of compounds **6** on the cell cycle phases in the concentration of C_{complex}=IC₅₀/10 does not differ significantly from the control.

Experimental Part

The ¹H NMR spectra were recorded on a Varian VXR-300 (300 MHz, for **HL**¹, **HL**², complexes **1-4**) and a Bruker Advance DRX-500 spectrometer (500.13 MHz for **HL**³, **HL**⁴, complexes **5**, **6**) in DMSO-d₆ solution using TMS as an internal standard. The PdCl₂ (Pd content 59%, Merck) was used as the starting metal salt. The X-ray structure data of complexes **4**, **5** were collected at room temperature on a SMART APEX II diffractometer. The thioureas **HL**¹-**HL**⁴ were prepared as described in [28-32].

[Pd(HL¹)Cl₂] (1). The synthesis of the complex was carried out in an acidic medium (pH 2.0-2.5) upon moderate (55°C) heating and constant stirring. Acidify the solution of PdCl₂ in ethanol with 4N HCl and add to the solution of thiourea **HL**¹ in ethanol (Pd:L=1:1). Reflux the reaction mixture for 10 min. While cooling filter the yellow precipitate formed, wash with diethyl ether, and dry over CaCl₂. Yield – 81%. M.p. ≥ 250°C_{decomp.} ¹H NMR δ , ppm: 4.18 br.s (2H, C⁷H₂), 5.28 dd (2H, =C⁹H₂, J=10.5 Hz and 17.4 Hz), 5.91 m (1H, =C⁸H), 7.24-7.47 m (2H, 2C^{2,4}H_{py}), 8.05 t (1H, C³H_{py}, J=8.1 Hz), 9.00 d (1H, C⁵H_{py}, J=6.0 Hz), 9.44 br.s (1H, N²H), 11.90 br.s (1H, N³H). Found, %: C 29.35, H 3.05, Cl 19.34, N 11.37, S 8.82. C₉H₁₁Cl₂N₃SPd. Calculated, %: C 29.19, H 2.97, Cl 19.14, N 11.35, S 8.65.

[Pd(HL¹)₂]Cl₂ (2). The synthesis was carried out in the molar ratio of Pd:L=1:2 in a similar way to the

previous complex. Yield – 55%. M.p. $\geq 230^\circ\text{C}_{\text{decomp}}$. ^1H NMR δ , ppm: 4.18 br.s (2H, C^7H_2), 5.27 dd (2H, $=\text{C}^9\text{H}_2$, $J=10.5$ and 17.4 Hz), 5.86-5.95 m (1H, $=\text{C}^8\text{H}$), 7.23-7.47 m (2H, $2\text{C}^{2,4}\text{H}_{\text{py}}$), 8.05 t (1H, $\text{C}^3\text{H}_{\text{py}}$, $J=8.1$ Hz), 9.00 d (1H, $\text{C}^5\text{H}_{\text{py}}$, $J=6.0$ Hz), 9.42 br.s (1H, N^2H), 11.87 br.s (1H, N^3H). Found, %: C 38.35, H 4.0, Cl 12.12, N 14.95, S 11.22. $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}_2\text{Pd}$. Calculated, %: C 38.37, H 3.91, Cl 12.61, N 14.92, S 11.37.

[Pd(HL²)₂Cl₂] \cdot 2H₂O (3). Dissolve the powder of PdCl₂ (2 mmol, 0.194 g) in 0.5 ml of 6N HCl by heating at 60°C, then dilute to 25 mL with ethanol. Add dropwise the solution (25 mL) of thiourea HL² (2 mmol, 0.223 g) in ethanol to the PdCl₂ solution in the molar ratio of M:L=1:1. Stir the reaction mixture and heat at 80°C for about 30 min. Isolate immediately a bright yellow precipitate. Filter the product and wash with small portions of ethanol, Et₂O and dry in vacuum over CaCl₂. Yield – 65%. M.p. – $236^\circ\text{C}_{\text{decomp}}$. ^1H NMR δ , ppm: 3.77 t (4H, $2\text{C}^{7,7'}\text{H}_2$, $J=4.8$ Hz), 4.03 t (4H, $2\text{C}^{8,8'}\text{H}_2$, $J=4.7$ Hz), 7.42 t (1H, $\text{C}^4\text{H}_{\text{py}}$, $J=7.7$ Hz), 7.52 d (1H, $\text{C}^2\text{H}_{\text{py}}$, $J=8.1$ Hz), 8.09 t (1H, $\text{C}^3\text{H}_{\text{py}}$, $J=7.9$ Hz), 8.97 d (1H, $\text{C}^5\text{H}_{\text{py}}$, $J=4.1$ Hz), 11.42 br.s (1H, N^2H). Found, %: C 27.34, H 4.32, Cl 16.13, N 9.95, S 7.47. $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3\text{SPd}$. Calculated, %: C 27.52, H 3.90, Cl 16.28, N 9.63, S 7.34.

[Pd(HL²)₂(ClO₄)₂] \cdot 2C₃H₆O (4). Dissolve the powder of PdCl₂ (1 mmol, 0.097 g) in 0.1 mL of 6N HCl by heating at 60 °C, then dilute with acetone to 25 mL. Add dropwise the solution (25 mL) of thiourea HL² (2 mmol, 0.223 g) in acetone to the PdCl₂ solution. After that add NaClO₄ (0.2 g) to the mixture obtained. Stir the reaction mixture and heat at 55°C for about 30 min, and then place into a desiccator with diethyl ether. After a few days of standing, yellow crystals are grown. Yield – 36% (0.123 g). M.p. – $207^\circ\text{C}_{\text{decomp}}$. ^1H NMR δ , ppm: 3.75 t (4H, $2\text{C}^{7,7'}\text{H}_2$, $J=4.9$ Hz), 4.00 t (4H, $2\text{C}^{8,8'}\text{H}_2$, $J=4.8$ Hz), 7.41 dd (1H, $\text{C}^4\text{H}_{\text{py}}$, $J=3.8$ and 7.5 Hz), 7.51 d (1H, $\text{C}^2\text{H}_{\text{py}}$, $J=8.2$ Hz), 8.09 dd (1H, $\text{C}^3\text{H}_{\text{py}}$, $J=2.1$ and 7.8 Hz), 8.98 d (1H, $\text{C}^5\text{H}_{\text{py}}$, $J=3.9$ Hz), 11.48 br.s (1 H, N^2H). Found, %: C 35.84, H 5.63, Cl 8.04, N 9.81, S 7.44. $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2\text{Pd}$. Calculated, %: C 35.97, H 4.41, Cl 8.19, N 9.68, S 7.39.

[Pd(HL³)Cl₂] \cdot H₂O (5). Dissolve the powder of PdCl₂ (44.2 mg, 0.25 mmol) in the mixture of 10 ml EtOH

and 2 ml 2N HCl. Add dropwise the ethanol solution (10 mL) of thiourea HL³ (46.6 mg, 0.25 mmol) to the resulting PdCl₂ solution under constant stirring. Stir the mixture and heat at 30-35°C for 10 min and leave for crystallization. Orange needle-shaped thin crystals are formed next day. Filter crystals and wash with ethanol and diethyl ether. Yield – 81% (77 mg). ^1H NMR δ , ppm: 3.76-3.67 m (8H, $2\text{C}^{5,5'}\text{H}_2+2\text{C}^{6,6'}\text{H}_2$), 3.99 d (1H, C^3H_2 , $J=18.7$ Hz), 4.25 d (1H, C^3H_2 , $J=18.7$ Hz), 4.59 d (1H, $=\text{C}^1\text{H}_{\text{trans}}$, $J=14.0$ Hz), 4.94 d (1H, $=\text{C}^1\text{H}_{\text{cis}}$, $J=7.5$ Hz), 6.17 m (1H, $=\text{C}^2\text{H}$), 9.16 s (1H, NH). Found: C 24.94, H 4.02, Cl 18.65, N 7.48, S 8.32. $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{PdS}$. Calculated, %: C 25.18, H 4.23, Cl 18.58, N 7.34, S 8.40.

[Pd(HL⁴)Cl₂] (6). Dissolve the powder of PdCl₂ (44.2 mg, 0.25 mmol) in the mixture of 10 ml EtOH and 2 ml 2N HCl. Add dropwise the ethanol solution (10 ml) of thiourea HL⁴ (43.0 mg, 0.25 mmol) to the PdCl₂ solution under constant stirring. In an hour filter a bit cloudy solution obtained and leave the resulting clear light-orange solution for crystallization. Red-brown prism-shaped crystals are formed in 2 days. Filter crystals and wash with ethanol and diethyl ether. Yield – 86% (75 mg). ^1H NMR δ , ppm: 1.36 s (9H, $3\text{C}^{6,7,8}\text{H}_3$), 4.06 d (1H, C^3H_2 , $J=17.0$ Hz), 4.20 d (1H, C^3H_2 , $J=18.0$ Hz), 4.33 d (1H, $=\text{C}^1\text{H}_{\text{trans}}$, $J=14.5$ Hz); 4.96 d (1H, $=\text{C}^1\text{H}_{\text{cis}}$, $J=7.5$ Hz), 6.16 m (1H, $=\text{C}^2\text{H}$), 8.34 s (1H, NH), 8.91 s (1H, N^2H). Found, %: C 27.2, H 4.5, Cl 20.22, N 8.16, S 9.25. $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{PdS}$. Calculated, %: C 27.48, H 4.61, Cl 20.28, N 8.01, S 9.17.

Conclusions

1. (*N*-pyridine-2-yl)thioureas react with PdCl₂ thereby forming the chelate-type complex compounds, in which ligands bind the metal ion by the sulphur atom of the thione group and the nitrogen atom of the pyridine ring.

2. An analogous reaction of *N*-allylthioureas results in formation of π -complexes involving the thione sulphur atom and the C=C double bond of the allylic moiety in coordination to palladium(II) ions.

3. The biological screening for Pd(II) π -complexes of the *N*-allylthiourea derivatives has exhibited *in vitro* their pronounced antitumor activity.

References

- Saeeda A., Flörke U., Erben M. F. *Journal of Sulfur Chemistry*, 2013. DOI: 10.1080/17415993.2013.834904.
- Özer C. K., Arslan H., VanDerveer D., Külcü N. *Molecules*, 2009, Vol. 14, No.2, pp.655-666.
- Saeed S., Rashid N., Ali M., Hussain R. *European Journal of Chemistry*, 2010, Vol. 1, No.3, pp.200-205.
- Kumar S. M. R., Selvakumar S., Kubendiran T., Selvam M., Elakiya R. V. T., Vimalan M. *Archives of Applied Science Research*, 2011, Vol. 3, No.1, pp.145-153.
- Maadeswaran P., Thirumalairajan S., Chandrasekaran J. *Optik*, 2010, Vol. 121, No.17, pp.1620-1624.
- Madarász J., Bombicz P., Okuya M., Kaneko S. *Solid State Ionics*, 2001, Vol. 141-142, pp.439-446.
- Bombicz P., Mutikainen I., Krunk M., Leskelä T., Madarász J., Niinistö L. *Inorganica Chimica Acta*, 2004, Vol. 357, No.2, pp.513-525.
- Kumar V., Chimni S. S. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2015, Vol. 15, No.2, pp.163-175.
- Li H.-Q., Yan T., Yang Y., Shi L., Zhou C.-F., Zhu H.-L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, Vol. 18, No.1, pp.305-313.
- Lv P.-C., Li H.-Q., Sun J., Zhou Y., Zhu H.-L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, Vol. 18, No.13, pp.4606-4614.
- Rafique S., Idrees M., Nasim A., Akbar H., Athar A. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2010, Vol. 5, No.2, pp.38-45.
- Sun R. W.-Y., Ma D.-L., Wong E. L.-M., Che C.-M. *Dalton Transactions*, 2007, No.43, pp.4884-4882.
- Zhang C. X., Lippard S. J. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, Vol. 7, No.4, pp.481-489.
- Kostova I. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2006, Vol. 1, No.1, pp.1-22.
- Puckett C. A., Ernst R. J., Barton J. K. J. *Chem. Soc., Dalton Transactions*, 2010, Vol. 39, No.5, pp.1159-1170.

16. Nita S., Andries A. A., Patron L., Albulescu R., Radulescu F., Tanase C., Vintila M. *Revista de Chimie (Bucharest)*, 2011, Vol. 62, No.5, pp.549-553.
17. Margiotta N., Denora N., Ostuni R., Laquintana V., Anderson A., Johnson S. W., Trapani G., Natile G. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, Vol. 53, No.14, pp.5144-5154.
18. Yan K., Lok C.-N., Bierla K., Che C.-M. *Chemical Communications*, 2010, Vol. 46, No.41, pp.7691-7693.
19. Marverti G., Cusumano M., Ligabue A., Di Pietro M. L., Vainiglia P. A., Ferrari A., Bergomi M., Moruzzi M. S., Frassinetti C. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, Vol. 102, No.4, pp.699-712.
20. D'Cruz O. J., Dong Y., Uckun F. M. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, Vol. 302, No.2, pp.253-264.
21. Del Campo R., Criado J. J., Gheorghe R., González F. J., Hermosa M. R., Sanz F., Manzano J. L., Monte E., Rodríguez-Fernández E. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, Vol. 98, No.8, pp.1307-1314.
22. Pearson R. G. *Inorganic Chemistry*, 1973, Vol. 12, No.3, pp.712-713.
23. Avsar G., Arslan H. *Turkish Journal of Chemistry*, 2003, Vol. 27, No.3, pp.281-285.
24. Schroder U., Richter R., Beyer L., Angulo-Cornejo J., Lino-Pacheco M., Guillen A. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 2003, Vol. 629, No.6, pp.1051-1058.
25. Joseph M., Kuriakose M., Kurup M. R. P., Suresh E., Kishore A., Bhat S. G. *Polyhedron*, 2006, Vol. 25, No.1, pp.61-70.
26. Бородкин Г. С., Бородкина И. Г., Ураев А. И., Васильченко И. С., Садеков И. Д., Гарновский А. Д. *Российский химический журнал*, 2004, Т. 58, №1, с.117-124.
27. Tardito S., Isella C., Medico E., Marchiò L., Bevilacqua E., Hatzoglou M., Bussolati O., Franchi-Gazzola R. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, No.36, pp.24306-24319.
28. Zborovskii Yu. L., Orysyk V. V., Staninets V. I., Rusanov E. B., Chernega A. N. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2007, Vol. 43, No.7, pp.1030-1034.
29. Bon V. V., Orysyk S. I., Pekhnyo V. I., Orysyk V. V., Volkov S. V. *Polyhedron*, 2007, Vol. 26, No.13, pp.2935-2941.
30. Kjaer A., Rubinstein K. *Acta Chemica Scandinavica*, 1953, Vol. 7, No.3, pp.528-536.
31. Henry R. A., Dehn W. M. *Journal of the American Chemical Society*, 1950, Vol. 72, No.6, pp.2806-2807.
32. Custelcean R., Gorbunova M. G., Bonnesen P. V. *Chemistry – A European Journal*, 2005, Vol. 11, No.5, pp.1459-1466.

Надійшла до редакції 06.11.2015 р.

UDC 547.792'233'57]-043.4

5,6-DIHYDRO-[1,2,4]TRIAZOLO[1,5-c]QUINAZOLINES. MESSAGE 1. FEATURES OF INTERACTIONS BETWEEN [2-(3-ARYL-1H-1,2,4-TRIAZOLE-5-YL)PHENYL]AMINES, ALIPHATIC AND AROMATIC ALDEHYDES

S.V.Kholodnyak, K.P.Schabelnyk, O.Yu.Voskoboynik, G.G.Berest, S.I.Kovalenko

Zaporizhzhia State Medical University
26, Mayakovsky av., Zaporizhzhia, 69035, Ukraine

Key words: 5-[2-(3-aryl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)phenyl]amines; [5+1]cyclocondensation; spectral characteristics

Reactions of [5+1]-cyclocondensation of [2-(3-aryl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)phenyl]amines with aliphatic and aromatic aldehydes produce the corresponding 5-R-2-aryl-5,6-dihydro- or 5-R-2-aryl-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines depending on the conditions. The optimal conditions of the reaction have been found, and factors contributing to oxidation of 5-R-2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines have been determined. The alternative synthetic approaches for 5-R-2-aryl-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines, namely oxidation of their reduced analogues and interaction of [2-(3-aryl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)phenyl]amines with acylhalides of aliphatic or aromatic carboxylic acid have been proposed. Purity and the structure of the compounds synthesized have been confirmed by the complex of physicochemical methods, including LC-MS, ¹H-, ¹³C NMR, mass-spectrometry and elemental analysis. The peculiarities and differences of ¹H- and ¹³C-NMR spectral patterns of 5-R-2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines and their aromatic analogues have been described.

5,6-ДИГІДРО-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[1,5-с]ХІНАЗОЛІНИ. ПОВІДОМЛЕННЯ 1. ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКИ [2-(3-АРИЛ-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-5-ІЛ)ФЕНІЛ]АМІНІВ В РЕАКЦІЯХ З АЛЬДЕГІДАМИ АЛІФАТИЧНОГО ТА АРОМАТИЧНОГО РЯДУ
С.В.Холодняк, К.П.Шабельник, О.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.І.Коваленко

Ключові слова: [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]аміни; [5+1]-циклоконденсація; спектральні характеристики

Реакції [5+1]-циклоконденсації [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]амінів з альдегідами аліфатичного та ароматичного ряду в залежності від умов проведення перебігають з утворенням 5-R-2-арил-5,6-дигідро- або 5-R-2-арил-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів. Визначені оптимальні умови реакції та встановлені основні фактори, які сприяють окисненню 5-R-2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів. Розроблені методи зустрічного синтезу 5-R-2-арил-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів: окисненням їх гідрованих аналогів або взаємодією [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]амінів з хлорангідрідами відповідних алкіл(арил)карбонових кислот. Індивідуальність та будова синтезованих сполук підтверджена хроматомас-, ¹H-, ¹³C-ЯМР-спектрами та елементним аналізом. Показані особливості та відмінності резонування характеристичних протонів 5-R-2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів та їх ароматичних аналогів.

5,6-ДИГІДРО-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[1,5-с]ХІНАЗОЛІНИ. СООБЩЕНИЕ 1. ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ [2-(3-АРИЛ-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-5-ІЛ)ФЕНІЛ]АМИНОВ В РЕАКЦІЯХ С АЛЬДЕГІДАМИ АЛІФАТИЧЕСКОГО И АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДУ
С.В.Холодняк, К.П.Шабельник, А.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.И.Коваленко

Ключевые слова: [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]аміни; [5+1]-циклоконденсація; спектральні характеристики

Реакции [5+1]-циклоконденсации [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]аминов с алифатическими и ароматическими альдегидами в зависимости от условий проведения образуют 5-R-2-арил-5,6-дигидроили 5-R-2-арил-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолины. Определены оптимальные условия реакции и установлены основные факторы, способствующие окислению 5-R-2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолинов. Разработан встречный синтез 5-R-2-арил-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолинов: окислением их гидрированных аналогов или взаимодействием [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]аминов с хлорангидридами соответствующих алкіл(арил)карбоновых кислот. Индивидуальность и строение синтезированных соединений подтверждены хроматомас-, ¹H-, ¹³C-ЯМР-спектрами, элементным анализом. Показаны особенности и отличие резонирования характеристических протонов 5-R-2-арил-5,6-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолинов и их ароматических аналогов.

Ever-growing interest in quinazoline derivatives [1, 2] as potential bioactive agents also attracts attention of the specialists in medicinal chemistry, especially to the condensed derivatives of the heterocyclic system mentioned above, in particular to [1,2,4]triazolo[c]quinazolines. It should be noted that according to the published papers the potential of heteroannelated quinazolines is not limited by their high biologic activity [3-5]. Moreover, these compounds

are also the study objects in chemistry of materials [6, 7] and chemistry of complex compounds [7]. Among the known methods suitable for the synthesis of the [1,2,4]triazolo[c]quinazoline system, the most used are: domino-reactions that leading to the simultaneous formation of quinazoline and triazole cycles, annulation of the triazole fragment to the quinazoline system and formation of the pyrimidine fragment based on modification of 2-(1H-1,2,4-triazol-5-yl)anilines

[1, 8]. It is important that the last-mentioned approach has advantages when it is necessary to vary the nature of a substituent in position 5 and saturation of the pyrimidine fragment. In spite of the fact that methods of the synthesis for [1,2,4]triazolo[*c*]quinazoline systems *via* interaction of substituted 2-(1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)anilines with electrophiles are known [7, 9], the objects of most studies published are target compounds and their properties, but not the [5+1]-cyclocondensation process and its peculiarities.

Considering the abovementioned facts we decided to study the interaction of [2-(3-aryl-1*H*-1,2,4-triazole-5-yl)phenyl]amines with carbonyl-containing compounds, as well as to determine the influence of their structure, the nature of solvents and the reaction conditions on the products' structure.

Results and Discussion

To improve the role of [5+1]-cyclocondensation processes in the synthesis of the triazolo[*c*]quinazoline system, [2-(3-aryl-1*H*-1,2,4-triazole-5-yl)phenyl] amines [10, 11] as 1,5-binucleophiles were used (**1.1-1.9**). It was found that interaction of these amines with aromatic and aliphatic aldehydes in the acetic acid medium for 3-6 h led to formation of the mixture of products. According to spectral data the components of this mixture were 5-*R*-2-aryl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines (**2**) and their aromatic analogues (**3**) in the ratio of 2:1. Further increase in the reaction duration more than 8 h in most cases led to the quantitative oxidation of the corresponding dihydroderivatives into 2-aryl-5-*R*-[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines (**3.1-3.14**) [10]. The most significant factors contributing to oxidation of com-

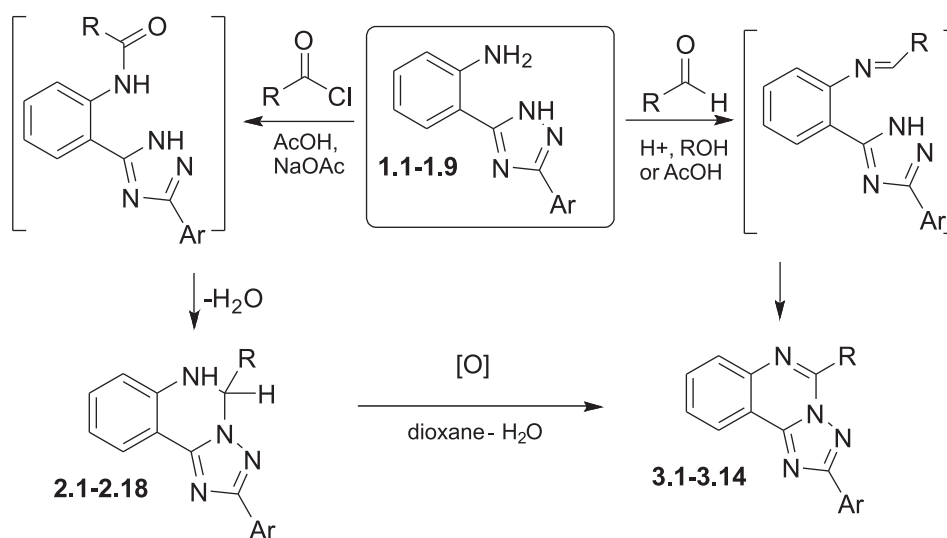
pounds **2** are a significant duration of the reaction and high temperature.

The experimental data has shown that compounds **2.1-2.18** may be obtained with excellent yields *via* refluxing the initial compounds mentioned above for 2-4 h in alcohols in the presence of an acidic catalyst, as well as with stirring in the same solvent at ambient temperature and under the atmosphere of for 24 h. It should be noted that this reaction may be performed in other solvents that are inert in relation to the initial substances (methanol, propanol-2, propanol-2, dioxane, acetic acid), but the inert atmosphere is the necessary condition.

Considering formation of compounds **2** it proceeded as double nucleophilic addition, wherein the corresponding Schiff base played the role of an intermediate. Further cyclisation progressed as a non-stereoselective transformation and yielded the racemic mixture of 5-*R*(*S*)-(alkyl-, cycloalkyl-, aryl-)-2-aryl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines (**2.1-2.18**).

For unequivocal evidence of the oxidation process 2-aryl-5-*R*-[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines were prepared according to two alternative protocols. The first approach was based on oxidation of compounds **2.1, 2.2, 2.4, 2.8** and **2.10** with bromine or potassium permanganate (Scheme). Compounds **3.8, 3.9** and **3.12** were obtained *via* reflux of anilines **1.1** and **1.8**, acylhalides of the corresponding aliphatic and aromatic carboxylic acid and the equimolar quantity of sodium acetate in acetic acid (Scheme). The reaction proceeded as a phased reaction that included acylation followed by cyclisation of the *N*-acyl derivative formed.

Purity and the structure of the compounds synthesized were confirmed by the complex of physico-



Ar = Ph, 2-CH₃C₆H₄, 3-CH₃C₆H₄, 3-CF₃C₆H₄, 3-FC₆H₄, 4-FC₆H₄, 2-ClC₆H₄, 3-CH₃OC₆H₄, 4-CH₃OC₆H₄; R = *i*-Pr, *i*-Bu, cyclo-Pr, cyclopentyl, cyclohexyl, Ph, 2-CH₃C₆H₄, 4-CH₃C₆H₄, 2-HOC₆H₄, 2-CF₃C₆H₄, 3-CF₃C₆H₄, 4-CF₃C₆H₄, 2-ClC₆H₄, 3-ClC₆H₄, 4-ClC₆H₄, 2-BrC₆H₄, 3-BrC₆H₄, 4-BrC₆H₄, 2-FC₆H₄, 3-FC₆H₄.

Scheme

chemical methods, including LC-MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, mass-spectrometry and elemental analysis. In LC-MS spectra of all compounds synthesized the high-intensity signals of quasi-molecular ions with the proper molecular weight were detected.

The formation of compounds **2.1-2.18** was proven by the presence of H-6 signals in ^1H NMR – spectra at the 7.65-6.90 ppm. For compounds **2.6-2.18** the signals mentioned overlapped with multiplets of the aryl moiety in position 5. Signals of H-5 in ^1H NMR spectra of compounds formed as a result of interaction between the initial anilines and aliphatic aldehydes **2.1-2.5** were observed as broad triplets or multiplets at 5.79-5.60 ppm. At the same time compounds containing the aromatic moiety in position 5 were characterized by the H-5 singlet at 7.16-6.93 ppm. Additionally ^1H NMR-spectra in CDCl_3 were registered for compounds **2.6** and **2.10**. It was shown that signals of H-5 and H-6 were observed as singlets at 5.48 ppm and the 4.76 ppm, respectively.

The protons of heterocyclic fragments were registered as sequentially located doublets H-10 (7.99-7.72 ppm) and H-7 (6.92-6.76 ppm) and triplets of H-8 (7.83-7.16 ppm), H-9 (6.98-6.72 ppm). Signals of substituents at positions 2 and 5 had chemical shifts that were in compliance with their structure [12].

At the same time ^1H NMR-spectra of compounds **3.1-3.14** differed significantly from spectra of the reduced analogues. The signals of H-10, H-9, H-8 and H-7 were observed in much more lower field. The signals of H-10 registered at 8.58-8.49 ppm were the most shifted in low field.

In ^{13}C NMR-spectra of compounds **2.10**, **3.13**, **3.14** the signals of C5 were the most characteristic. Thus, for compound **2.10** the signal mentioned was registered at 67.11 ppm, but for **3.13** and **3.14** – at 147.26 ppm and 148.15 ppm, respectively, indicating the different hybridization state of carbon.

The spectral characteristics definitely proved the structure of both 6,7-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazoline system and their aromatic analogues.

Experimental Part

Melting points were determined in open capillary tubes and were uncorrected. The elemental analyses (C, H, N, S) were performed using an ELEMENTAR vario EL Cube analyzer (USA). Analyses were indicated by the symbols of the elements or functions within $\pm 0.3\%$ of the theoretical values. ^1H NMR spectra (400 MHz) and ^{13}C NMR spectra (100 MHz) were recorded on a Varian-Mercury 400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) spectrometer with TMS as an internal standard in DMSO- d_6 solution. LC-MS were recorded using the chromatography/mass spectrometric system consisting of an "Agilent 1100 Series" high performance liquid chromatograph (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode-matrix and an "Agi-

lent LC/MSD SL" mass-selective detector (atmospheric pressure chemical ionization – APCI).

Synthetic procedures were conducted according to the commonly used approaches for the synthesis of prospective bioactive agents. All reagents were commercially available ("Sigma-Aldrich", Missouri, USA and "Enamine", Kiev, Ukraine) and used without addition purification. 2-(3-Aryl-1*H*-1,2,4-triazole-5-yl)phenylamines (**1.1-1.9**) were obtained according to the synthetic protocols described [10, 11].

The general method for the synthesis of 5-R¹-2-aryl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines (2.1-2.18). Add 10 mmol of aromatic or aliphatic aldehyde to the solution of 10 mmol of the corresponding {2-[3-aryl-1*H*-1,2,4-triazolo-5-yl]phenyl}amine (**1.1-1.9**) in 10 ml of glacial acetic acid or 10 ml of propanol-2. When using propanol-2 as a solvent add two drops of sulphuric or hydrochloric acid. Reflux the mixture obtained for 2 h or stir at ambient temperature for 24 h in the atmosphere of nitrogen. Then cool the mixture and pour into the saturated solution of sodium acetate. Filter the precipitate formed and dry. In case of insufficient purity recrystallize the compounds obtained from methanol.

The compounds (**2.1-2.18**) synthesized are white crystalline powders, insoluble in water, soluble in alcohols, dioxane and DMF.

*5-Isopropyl-2-(3-methoxyphenyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazoline (2.1).* Yield – 40.9%. M.p. – 184-186°C; ^1H NMR (400 MHz, dms_d) δ 7.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-10), 7.83 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-8), 7.32-7.12 (m, 2H, H-5 PhOCH₃-3, H-6), 7.16 (m, 2H, H-2,6 PhOCH₃-3), 6.91 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-4 PhOCH₃-3), 6.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-7), 6.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9), 5.71 (m, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-5), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 2.40 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 1.03 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, -CH(CH₃)₂), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, -CH(CH₃)₂); LC-MS, $m/z = 321$ [M+1], 322 [M+2]; Anal. calcd. for C₁₉H₂₀N₄O: C, 71.23; H, 6.29; N, 17.49; Found: C, 71.26; H, 6.31; N, 17.52.

*5-Isobutyl-2-(3-fluorophenyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazoline (2.2).* Yield – 40.9%. M.p. – 129-131°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}_d + \text{CCl}_4$) δ 7.92 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-10), 7.79 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 7.45 (m, 2H, H-2,6 PhF-3), 7.19 (m, 1H, H-5 PhF-3), 7.11 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-9), 6.92 (s, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 6.78 (m, 1H, H-4 PhF-3), 5.79 (m, 1H, H-5), 2.02 (m, 1H, -CH₂CH(CH₃)₂), 1.57 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, -CH₂CH(CH₃)₂), 1.13 (d, $J = 5.3$ Hz, 6H, -CH₂CH(CH₃)₂); LC-MS, $m/z = 323$ [M+1], 324 [M+2]; Anal. calcd. for C₁₉H₁₉FN₄: C, 70.79; H, 5.94; N, 17.38; Found: C, 70.76; H, 5.91; N, 17.33.

*5-Cyclopropyl-2-phenyl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazoline (2.3).* Yield – 41.6%. M.p. – 157-159°C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}_d + \text{CCl}_4$) δ 8.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 7.87 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-10), 7.53-7.49 (m, 1H, H-8), 7.49-7.36 (m, 3H, H-3, 5 Ph, H-6), 7.36-7.29 (m, 1H, H-4 Ph), 6.91 (t, $J = 7.5$ Hz,

1H, H-9), 6.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 5.60 (m, $J = 5.8$ Hz, 1H, H-5), 3.69-3.60 (m, 1H, H-2 cyclopropyl), 3.60-3.51 (m, 1H, H-3 cyclopropyl), 2.83-2.71 (m, 1H, H-1 cyclopropyl), 2.30-2.13 (m, 2H, H-2, 3 cyclopropyl); LC-MS, $m/z = 289$ [M+1], 290 [M+2]; Anal. calcd. for $C_{18}H_{16}N_4$: C, 74.98; H, 5.59; N, 19.43; Found: C, 75.01; H, 5.62; N, 19.45.

5-Cyclohexyl-2-phenyl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.4). Yield – 61.8%. M.p. – 196-198°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.12 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 7.72 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 7.48-7.36 (m, 4H, H-3, 4, 5 Ph, H-6), 7.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 6.84 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-9), 6.76 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 5.66 (bs. t, 1H H-5), 2.38 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H, H-3,5 cyclohexyl), 2.22 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H, H-3,5 cyclohexyl), 1.98-1.75 (m, 4H, H-2,6 cyclohexyl), 1.70-1.75 (m, 1H, H-1 cyclohexyl), 1.24-1.11 (m, 3H, H-4 cyclohexyl); LC-MS, $m/z = 331$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{22}N_4$: C, 76.33; H, 6.71; N, 16.96; Found: C, 76.35; H, 6.74; N, 17.01.

2-(3-Methoxyphenyl)-5-cyclohexyl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.5). Yield – 71.3%. M.p. – 176-177°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6$) δ 7.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 7.66 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-6 PhOCH₃-3), 7.60 (s, 1H, H-2 PhOCH₃-3), 7.32 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5 PhOCH₃-3), 7.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 6.90 (m, 2H, H-6, H-9), 6.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 6.72 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-9), 5.69 (m, 1H, H-5), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 1.71-1.51 (m, 4H, H-3,5 cyclohexyl), 1.53-1.34 (m, 4H, H-2,6 cyclohexyl), 1.24 (m, 3H, H-1, 4 cyclohexyl); LC-MS, $m/z = 361$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{24}N_4O$: C, 73.31; H, 6.71; N, 15.54; Found: C, 73.34; H, 6.74; N, 15.57.

2,5-Diphenyl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.6). Yield – 98.7%. M.p. – 175-177°C; NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-2,6 2-Ph), 7.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-10), 7.65 (t, 1H, H-4 2-Ph), 7.52 (t, 1H, H-4 5-Ph), 7.47-7.31 (m, 7H, H-3,5 2-Ph, H-2,3,5,6 5-Ph, H-6), 7.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-8), 6.93-6.75 (m, 3H, H-5,7,9); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 8.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-10), 7.53 (m, 2H, H-4 2-Ph, H-4 5-Ph), 7.45-7.40 (m, 6H, H-3,5 2-Ph, H-2,3,5,6 5-Ph), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-8), 6.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9), 6.84 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 6.35 (s, 1H, H-5), 5.48 (s, 1H, H-6); LC-MS, $m/z = 325$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{16}N_4$: C, 77.76; H, 4.97; N, 17.27; Found: C, 77.73; H, 4.94; N, 17.24.

2-Phenyl-5-(2-hydroxyphenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.7). Yield – 98.2%. M.p. – 170-172°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.01 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-2,6 Ph), 7.81 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-10), 7.44-7.30 (m, 3H, H-3,4,5 Ph), 7.30-7.09 (m, 6H, H-3,4,5,6 2-HOPh, H-6, H-8), 7.02 (s, 1H, H-5), 6.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 6.80 (t, 7.4 Hz 1H, H-9), 2.50 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, -OH); LC-MS, $m/z = 341$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{16}N_4O$: C, 74.10; H, 4.74; N, 16.46; Found: C, 74.07; H, 4.70; N, 16.42.

2-Phenyl-5-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.8). Yield – 96.9%. M.p. – 190-191°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.00 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-3 2-CF₃Ph), 7.80 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-10), 7.69-7.53 (m, 3H, H-3,4,5 Ph), 7.36 (m, 4H, H-4,5,6 2-CF₃Ph, H-6), 7.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-8), 7.11 (s, 1H, H-5), 6.94-6.79 (m, 2H, H-7,9); LC-MS, $m/z = 393$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{15}F_3N_4$: C, 67.34; H, 3.85; N, 14.28; Found: C, 67.36; H, 3.90; N, 14.31.

2-Phenyl-5-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.9). Yield – 86.7%. M.p. – 168-170°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-2,6 Ph), 7.84 (m, 1H, H-2 3-CF₃Ph, H-10), 7.65 (s, 1H, H-6), 7.57 (m, 3H, H-4,6 3-CF₃Ph, H-4 Ph), 7.46-7.32 (m, 2H, H-5 3-CF₃Ph, H-3,5 Ph), 7.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-8), 7.00 (s, 1H, H-5), 6.91 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 6.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9); LC-MS, $m/z = 393$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{15}F_3N_4$: C, 67.34; H, 3.85; N, 14.28; Found: C, 67.33; H, 3.87; N, 14.26.

2-Phenyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.10). Yield – 55.1%. M.p. – 166-168°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.05 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 7.81 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-10), 7.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-2,6 4-CF₃Ph), 7.62-7.53 (m, $J = 8.5$ Hz, 3H, H-3,5 4-CF₃Ph, H-6), 7.46-7.32 (m, 3H, H-3,4,5 Ph), 7.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 6.99 (s, 1H, H-5), 6.89 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 6.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 8.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-10), 7.59 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-2,6 PhCF₃), 7.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-3,5 PhCF₃), 7.44-7.34 (m, 3H, H-3,4,5 Ph), 7.27 (m, 2H, H-8, CHCl₃), 6.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9), 6.78-6.73 (m, 2H, H-7, H-5), 4.76 (s, 1H, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 158.12 (C-2), 145.47 (C-6a), 137.48 (C-1, PhCF₃), 136.21 (C-10b), 127.19, 126.01, 124.66, 123.76, 122.46, 121.79, 121.21, 120.32, 115.74, 110.17, 106.80 (C-10a), 67.11 (C-5); LC-MS, $m/z = 393$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{15}F_3N_4$: C, 67.34; H, 3.85; N, 14.28; Found: C, 67.34; H, 3.85; N, 14.28.

2-Phenyl-5-(2-chlorophenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.11). Yield – 92.7%. M.p. – 204-206°C; 1H NMR (400 MHz, $DMSO_D_6 + CCl_4$) δ 8.04 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-2,6 Ph), 7.84 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-10), 7.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3 2-ClPh), 7.45-7.31 (m, 5H, H-3,4,5 Ph, H-5 2-ClPh, H-6), 7.28 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-8), 7.25-7.16 (m, 3H, H-4,6 2-ClPh, H-5), 6.92-6.78 (m, 2H, H-7, 9); LC-MS, $m/z = 359$ [M+1], 361 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{15}ClN_4$: C, 70.29; H, 4.21; N, 15.61; Found: C, 70.33; H, 4.24; N, 15.63.

2-Phenyl-5-(3-chlorophenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.12). Yield – 94.9%. M.p. – 150-152°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.07 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-2,6 Ph), 7.82 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-10), 7.54 (s, 1H, H-6), 7.47 (s, 1H, H-2 3-ClPh), 7.45-7.31 (m, 4H, H-3,5 Ph, H-4,5 3-ClPh), 7.31-7.17 (m, 3H, H-4 Ph, H-6 3-ClPh, H-8), 6.94-6.86 (m, 2H, H-5, 7),

6.83 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-9); LC-MS, $m/z = 359$ [M+1], 361 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{15}ClN_4$: C, 70.29; H, 4.21; N, 15.61; Found: C, 70.26; H, 4.19; N, 15.59.

2-Phenyl-5-(4-chlorophenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.13). Yield – 84.3%. M.p. – 172-174°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-2,6 Ph), 7.80 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-10), 7.48 (s, 1H, H-6), 7.46-7.26 (m, 7H, H-2,3,5,6 4-ClPh, H-3,4,5 Ph), 7.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 6.93-6.86 (m, 2H, H-5, 7), 6.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9); LC-MS, $m/z = 359$ [M+1], 361 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{15}ClN_4$: C, 70.29; H, 4.21; N, 15.61; Found: C, 70.31; H, 4.23; N, 15.60.

5-(2-Bromophenyl)-2-phenyl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.14). Yield – 93.0%. M.p. – 209-210°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.04 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, P-2,6 Ph), 7.84 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-10), 7.67 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-3 2-BrPh), 7.47-7.16 (m, 5H, H-6, H-3,4,5 Ph, H-4,5,6 2-BrPh, H-5), 6.95-6.79 (m, 2H, H-7, 9); LC-MS, $m/z = 404$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{15}BrN_4$: C, 62.54; H, 3.75; N, 13.89; Found: C, 62.56; H, 3.78; N, 13.90.

5-(3-Bromophenyl)-2-phenyl-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.15). Yield – 84.6%. M.p. – 174-176; LC-MS, $m/z = 404$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{15}BrN_4$: C, 62.54; H, 3.75; N, 13.89; Found: C, 62.52; H, 3.73; N, 13.87.

2-(2-Chlorophenyl)-5-(2-fluorophenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.16). Yield – 93.3%. M.p. – 128-130°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 7.89 (m, 1H, H-6 2-ClPh), 7.81 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-10), 7.51-7.31 (m, 5H, H-3,5 2-FPh, H-3,5 2-ClPh, H-6), 7.29-7.06 (m, 5H, H-4 2-ClPh, H-4,6 2-FPh, H-5, H-8), 6.94-6.76 (m, 2H, H-7, H-9); LC-MS, $m/z = 377$ [M+1], 379 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{14}ClFN_4$: C, 66.94; H, 3.74; N, 14.87; Found: C, 66.92; H, 3.70; N, 14.84.

2-(2-Chlorophenyl)-5-(2-methylphenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines (2.17). Yield – 93.9%. M.p. – 197-199°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 7.89-7.82 (m, 1H, H-6 2-ClPh), 7.79 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-10), 7.49-7.40 (m, 1H, H-3 2-ClPh), 7.40-7.14 (m, 8H, H-6, H-3,4,5,6 2-CH₃Ph, H-4,5 2-ClPh, H-8), 7.05 (s, 1H, H-5), 6.88 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 6.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-9), 2.50 (s, 3H, -CH₃); LC-MS, $m/z = 373$ [M+1], 375 [M+3] Anal. calcd. for $C_{22}H_{17}ClN_4$: C, 70.87; H, 4.60; N, 15.03; Found: C, 70.91; H, 4.63; N, 15.05.

5-(2-Methylphenyl)-2-(3-fluorophenyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (2.18). Yield – 62.1%. M.p. – 225-227°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 7.83 (m, 2H, H-2,6 3-FPh), 7.71 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-10), 7.53 (m, 1H, H-6), 7.49-7.34 (m, 2H, H-4,5 3-FPh), 7.34-7.14 (m, 2H), 7.14-7.05 (t, 1H, H-8), 7.03 (s, 1H, H-5), 6.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 6.81 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-9), 2.52 (s, 1H, -CH₃); Anal. calcd. for $C_{22}H_{17}FN_4$: C, 74.14; H, 4.81; N, 15.72; Found: C, 74.16; H, 4.84; N, 15.73.

The general method for the synthesis of 5-R¹-2-aryl-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines (3.1-3.14)

Method A. To the solution of 10 mmol of the corresponding {2-[3-aryl-1H-1,2,4-triazol-5-yl]phenyl} amine (**1.1-1.9**) in 10 ml of glacial acetic acid add 10 mmol of aliphatic or aromatic aldehyde. Reflux the mixture obtained for 8 h. Then cool the mixture and pour into the saturated solution of sodium acetate. Filter the precipitate formed and dry. In case of insufficient purity recrystallize the compounds obtained from methanol.

Method B. To the solution of 10 mmol of the corresponding 5-R¹-2-aryl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (**2.2, 2.4, 2.8, 2.10**) in 10 ml of water – dioxane mixture (1:3) add dropwise 11 mmol of bromine or potassium permanganate at 40°C. Reflux the mixture obtained for 8 h. Then cool the mixture and pour into the saturated solution of sodium acetate. Filter the precipitate formed and dry. In case of insufficient purity recrystallize the compounds obtained from propanol-1.

Method C. To the solution of 10 mmol of {2-[3-phenyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl]phenyl}amine (**5.1**) in 10 ml of glacial acetic acid add 0.9 g. (11 mmol) of sodium acetate. Cool the mixture obtained to 3-5°C and add dropwise 11 mmol of the corresponding acyl halide while stirring. Then reflux the reaction mixture for 6 h. After refluxing cool the mixture, and evaporate the solvent under vacuum. Then add 10 ml of methanol, filter the precipitate and dry. Compounds **3.1-3.14** that were obtained according to methods A, B, C had the same physicochemical constants and spectral characteristics.

The compounds (**3.1-3.14**) synthesized are white crystalline powders, insoluble in water, soluble in alcohols, dioxane and DMF.

5-Isopropyl-2-(4-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (3.1). Yield – 48.7 (Method A), 86.8% (Method B). M.p. – 150-152°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-10), 8.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-2,6 PhOCH₃-4), 8.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.83 (t, 1H, H-9), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-8), 7.04 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-3,5 PhOCH₃-4), 4.04 (dt, $J = 14.7, 7.4$ Hz, 1H, (CH₃)₂CH-), 3.89 (s, 1H, OCH₃), 1.56 (s, 6H, (CH₃)₂CH-); LC-MS, $m/z = 319$ [M+1]; Anal. calcd. for $C_{19}H_{18}N_4O$: C, 71.68; H, 5.70; N, 17.69; Found: C, 71.69; H, 5.75; N, 17.67.

5-Isobutyl-2-(3-fluorophenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (3.2). Yield – 60.3% (Method A), 91.8% (Method B). M.p. – 129-131°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-10), 8.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 8.03-7.97 (m, 2H, H-2,6 PhF-3), 7.87 (m, 1H, H-9), 7.75 (m, 1H, H-8), 7.56 (m, 1H, H-5 PhF-3), 7.26 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4 PhF-3), 3.27 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, -CH₂CH(CH₃)₂), 2.69-2.56 (m, 1H, -CH₂CH(CH₃)₂), 1.14 (s, $J = 5.3$ Hz, 6H, -CH₂CH(CH₃)₂); LC-MS, $m/z = 321$ [M+1], 323 [M+3]; Anal. calcd.

for $C_{19}H_{17}FN_4$: C, 71.23; H, 5.35; N, 17.49; Found: C, 71.20; H, 5.31; N, 17.46.

5-Cyclopentyl-2-(4-fluorophenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (3.3). Yield – 39.5% (Method A). M.p. – 196-198°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.49 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-10), 8.40-8.31 (m, 2H, H-2,6 PhF-4), 7.96 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-7), 7.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-9), 7.72 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-8), 7.33-7.22 (m, 2H, H-3,5 PhF-4), 4.13 (dt, $J = 13.7, 6.7$ Hz, 1H, H-1 cyclopentyl), 2.32 (dd, $J = 17.0, 9.4$ Hz, 2H, H-2,5 cyclopentyl), 2.23-2.11 (m, 2H, H-2,5 cyclopentyl), 2.02-1.88 (m, 2H, H-3,4 cyclopentyl), 1.83 (dd, $J = 13.7, 12.0$ Hz, 2H, H-3,4 cyclopentyl); LC-MS, $m/z = 333$ [M+1], 335 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{20}H_{17}FN_4$: C, 72.27; H, 5.16; N, 16.86; Found: C, 72.31; H, 5.19; N, 16.88.

2-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-5-cyclopentyl-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.4). Yield – 49.9% (Method A). M.p. – 138-140°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.58 (m, 2H, H-2, 6 PhCF₃-3), 8.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-10), 7.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-7), 7.87 (t, 1H, H-9), 7.84-7.71 (m, 3H, H-8, H-4, 5 PhCF₃-3), 4.22 (qun, $J = 15.9, 7.8$ Hz, 1H, H-1 cyclopentyl), 2.39-2.25 (m, 2H, H-2,5 cyclopentyl), 2.25 – 2.12 (m, 2H, H-2,5 cyclopentyl), 2.02-1.90 (m, 2H, H-3,4 cyclopentyl), 1.90-1.79 (m, 2H, H-3,4 cyclopentyl); Anal. calcd. for $C_{21}H_{17}F_3N_4$: C, 65.96; H, 4.48; N, 14.65; Found: C, 66.01; H, 4.53; N, 14.68.

2-(3-Methoxyphenyl)-5-cyclopentyl-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.5). Yield – 70.1% (Method A). M.p. – 149-151°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6$) δ 8.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 7.96 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-6 PhOCH₃-3), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 7.88-7.79 (m, 2H, H-2, 5 PhOCH₃-3), 7.72 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-9), 7.42 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-8), 7.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-4 PhOCH₃-3), 4.22-4.08 (m, 1H, H-1 cyclopentyl), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 2.31 (dt, $J = 11.9, 8.1$ Hz, 2H, H-2,5 cyclopentyl), 2.19 (dt, $J = 20.2, 7.3$ Hz, 2H, H-2,5 cyclopentyl), 2.01-1.90 (m, 2H, H-3,4 cyclopentyl), 1.90-1.76 (m, 2H, H-3,4 cyclopentyl); LC-MS, $m/z = 345$ [M+1], 347 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{20}N_4O$: C, 73.23; H, 5.85; N, 16.27; Found: C, 73.20; H, 5.83; N, 16.24.

5-Cyclohexyl-2-phenyl-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.6). Yield – 85.4% (Method B). M.p. – 196-198°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.51 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 8.34 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 7.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.85 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-9), 7.72 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-8), 7.53 (m, 3H, H-3,4,5 Ph), 3.77 (t, 1H, H-1 cyclohexyl), 2.22 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H, H-2, 6 cyclohexyl), 2.00 (d, 2H, H-2, 6 cyclohexyl), 1.93-1.78 (m, 4H, H-3, 5 cyclohexyl), 1.70-1.55 (m, 2H, H-4 cyclohexyl); LC-MS, $m/z = 329$ [M+1], 331 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{21}H_{20}N_4$: C, 76.80; H, 6.14; N, 17.06; Found: C, 76.78; H, 6.12; N, 17.04.

2-(3-Methoxyphenyl)-5-cyclohexyl-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.7). Yield – 43.0% (Method A). M.p. – 176-177°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6$) δ

8.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 7.96 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7), 7.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-6 PhOCH₃-3), 7.88-7.77 (m, 2H, H-9, H-2 PhOCH₃-3), 7.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-8), 7.42 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5 PhOCH₃-3), 7.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-4 PhOCH₃-3), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 3.76 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1 cyclohexyl), 2.22 (dd, $J = 12.0, 2H, H-2, 6$ cyclohexyl), 1.99 (d, 2H, H-2, 6 cyclohexyl), 1.84-1.80 (m, 2H, H-3, 5 cyclohexyl), 1.71-1.51 (m, 2H, H-3, 5 cyclohexyl), 1.42 (m, 2H, H-4 cyclohexyl); LC-MS, $m/z = 359$ [M+1], 361 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{22}N_4O$: C, 73.72; H, 6.19; N, 15.63; Found: C, 73.74; H, 6.21; N, 15.65.

5-(4-Methylphenyl)-2-phenyl-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.8). Yield – 94.6% (Method A), 67.8% (Method C). M.p. – 183-185°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.61-8.51 (m, 3H, H-2,6 PhCH₃-4, H-10), 8.33 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 8.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 7.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-9), 7.75 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-8), 7.52 (m, 3H, H-3, 4, 5 Ph), 7.41 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-3,5 PhCH₃-4), 2.50 (s, 1H, -CH₃); LC-MS, $m/z = 337$ [M+1], 339 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{16}N_4$: C, 78.55; H, 4.79; N, 16.66; Found: C, 78.56; H, 4.81; N, 16.67.

5-(4-Bromophenyl)-2-phenyl-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.9). Yield – 41.8% (Method A), 78.3% (Method C). M.p. – 217-219°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2,6 Ph), 8.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 8.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2,6 PhBr-4), 8.10 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.92 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-9), 7.85-7.77 (m, 3H, H-8, H-3,5 PhBr-4), 7.60-7.48 (m, 3H, H-3,4,5 Ph); Anal. calcd. for $C_{21}H_{13}BrN_4$: C, 62.86; H, 3.27; N, 13.96; Found: C, 62.88; H, 3.31; N, 14.01.

2-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-5-(3-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.10). Yield – 39.7% (Method A). M.p. – 148-150°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.65-8.50 (m, 5H, H-2,6 PhF-3, H-2,6 PhCF₃-3, H-10), 8.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 8.10 (m, 1H, H-9), 7.94 (dd, $J = 15.6, 7.8$ Hz, 1H, H-5 PhCF₃-3), 7.88-7.73 (m, 2H, H-8, H-4 PhCF₃-3), 7.68 (dd, $J = 14.6, 7.2$ Hz, 1H, H-5, PhF-3), 7.44 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4 PhF-3); LC-MS, $m/z = 409$ [M+1], 411 [M+3]; Anal. calcd. for $C_{22}H_{12}F_4N_4$: C, 64.71; H, 2.96; N, 13.72; Found: C, 64.72; H, 2.99; N, 13.75.

2-(3-Methylphenyl)-5-(3-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.11). Yield – 41.6% (Method A). M.p. – 141-143°C; 1H NMR (400 MHz, $dmsO_d_6 + CCl_4$) δ 8.99 (m, 2H, H-2 PhCF₃-3, H-10), 8.60 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-7), 8.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-4, 6 PhCF₃-3), 8.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6 PhCH₃-3), 8.03-7.78 (m, 3H, H-9, H-5 PhCF₃-3, H-5 PhCH₃-3), 7.35 (m, 2H, H-8, H-4 PhCH₃-3), 2.47 (s, 2H); LC-MS, $m/z = 405$ [M+1], 406 [M+2]; Anal. calcd. for $C_{23}H_{15}F_3N_4$: C, 68.31; H, 3.74; N, 13.85; Found: C, 68.29; H, 3.72; N, 13.81.

2-(3-Methoxyphenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline (3.12). Yield – 37.9% (Method A), 61.6% (Method C). M.p. – 217-219°C; 1H NMR (400 MHz,

dmso-d₆+CCl₄) δ 8.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-2,6 PhCl-4), 8.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-10), 8.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 7.91-7.87 (m, 2H, H-9, H-6 PhOCH₃-3), 7.85-7.76 (m, 2H, H-8, H-2 PhOCH₃-3), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3,5 PhCl-4), 7.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-5 PhOCH₃-3), 7.04 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-4 PhOCH₃-3), 3.92 (s, 3H, -OCH₃); LC-MS, *m/z* = 387 [M+1], 389 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₂H₁₅ClN₄O: C, 68.31; H, 3.91; N, 14.48; Found: C, 68.34; H, 3.93; N, 14.51.

2-Phenyl-5-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (3.13). Yield – 43.8% (Method B). M.p. – 192-194°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-10), 8.26 (н.р. d, 2H, H-2,6 Ph), 8.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 7.94-7.83 (m, 2H, H-9, H-6 PhCF₃-2), 7.82-7.71 (m, 4H, H-8, H-3,4,5 PhCF₃-2), 7.48-7.36 (m, 3H, H-3,4,5 Ph); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.60 (C-2), 147.26 (C-5), 137.95 (C-6a), 127.39 (C-10b), 127.08, 126.26, 125.95, 125.65, 125.33, 124.16, 124.14, 123.87, 123.71, 122.93, 122.39, 121.85, 120.22, 119.10, 112.93 (C-10a); Anal. calcd. for C₂₂H₁₃F₃N₄: C, 67.69; H, 3.36; N, 14.35; Found: C, 67.71; H, 3.39; N, 14.36.

2-Phenyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (3.14). Yield – 57.3% (Method B). M.p. – 205-207°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2,6 PhCF₃-4), 8.64 (d, *J* = 7.9 Hz,

1H, H-10), 8.38 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H-2, 6 Ph), 8.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7), 7.93-7.82 (m, 3H, H-3,5 PhCF₃-4, H-9), 7.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 7.59-7.46 (m, 3H, H-3,4,5 Ph); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.48 (C-2), 148.14 (C-5), 140.11 (C-6a), 137.95 (C-10b), 130.34, 127.47, 126.12, 125.87, 125.27, 124.14, 124.03, 124.00, 122.90, 120.57, 120.53, 120.50, 119.10, 112.77 (C-10a); LC-MS, *m/z* = 391[M+1], 393 [M+3]; Anal. calcd. for C₂₂H₁₃F₃N₄: C, 67.69; H, 3.36; N, 14.35; Found: C, 67.68; H, 3.35; N, 14.35.

Conclusions

The reaction of [2-(3-aryl-1H-1,2,4-triazole-5-yl)phenyl]amines with aliphatic and aromatic aldehydes is a suitable method for the synthesis of 5-(alkyl-, cycloalkyl-, aryl)-2-aryl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines. These compounds are oxidizable; therefore, the inert gas atmosphere is the necessary condition for the [5+1]-cyclocondensation process. On the other hand, this property allows to use 5-(alkyl-, cycloalkyl-, aryl)-2-aryl-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolines as the initial compounds for the synthesis of their aromatic analogues. The convenient synthetic procedures for compounds **2** and **3** have been proposed, and the mechanism of these transformations has been discussed.

References

1. Khan I, Ibrar A, Abbas N, Saeed A. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, Vol. 76, pp.193-244 doi: 10.1016/j.ejmech.2014.02.005.
2. Wang D, Gao F. *Chemistry Central Journal*, 2013, Vol. 7, p.95. doi:10.1186/1752-153X-7-95.
3. Bilyi A. K., Antypenko L. M., Ivchuk V. V., Kamyshnyi O. M., Polishchuk N. M., Kovalenko S. I. *Chem. Plus Chem.*, 2015, Vol. 6, pp.980-989. doi:10.1002/cplu.201500051.
4. Antypenko L. N., Karpenko A. V., Kovalenko S. I., Katsev A. M., Komarovska-Porokhnyavets E. Z., Novikov V. P., 2009, Vol. 342 (11), pp.651-662. doi:10.1002/ardp.200900077.
5. Špirková K., Stankovský Š., Dandárová M. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1994, Vol. 59 (1), pp.222-226. doi:10.1135/cccc19940222.
6. Korshak V. V., Rusanov A. L., Iremashvili Ts G., Zhuravleva I. V., Baranov E. L. *Macromolecules*, 1973, Vol. 6 (4), pp.483-492. doi:10.1021/ma60034a002.
7. Gusev A. N., Shul'gin V. F., Topilova Z. M., Meshkova S. B. *Russian Chemical Bulletin*, Vol. 61 (1), pp.95-98. doi:10.1007/s11172-012-0014-9.
8. Karpenko A.V., Kovalenko S. I., Shishkina S. V., Shishkin O. V. *Chemical Monthly*, 2006, Vol. 137 (12), pp.1543-1549. doi:10.1007/s00706-006-0545-6.
9. Borioni A., Del Giudice M. R., Ferretti R., Mustazza C., Rodomonte A., Sbraccia M., Sestili I. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; 2006, Vol. 54 (5), pp.611-622. doi:10.1248/cpb.54.611.
10. Kovalenko S. I., Antypenko L. M., Bilyi A. K., Kholodnyak S. V., Karpenko O. V., Antypenko O. M. et al. *Scientia Pharmaceutica*, 2013, Vol. 81 (2), pp.359-391. doi:10.3797/scipharm.1211-08.
11. Kovalenko S. I., Voloshina V. O., Karpenko O. V. *Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii – Journal of Organic and Pharmaceutical*, 2010, Vol. 8 (2(80)), pp.48-56.
12. Gunther H. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3rd Edition., Wiley, 2013, 734 p.

Надійшла до редакції 05.11.2015 р.

УДК 547.781.4 + 547.824 + 615.31

СИНТЕЗ ТА ОЦІНКА БАКТЕРИЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ 4-(4-ХЛОРО-1Н-ІМІДАЗОЛ-5-ІЛ)-2-ОКСО- 1,2-ДИГІДРОПІРИДИН-3-КАРБОНІТРИЛІВ

О.Я.Мельник, В.О.Чорноус*, Н.Д.Яковичук*, Н.В.Мельниченко**, М.В.Вовк**

Івано-Франківський національний медичний університет
76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2

* Буковинський державний медичний університет

** Інститут органічної хімії НАН України

Ключові слова: 5-форміл-4-хлороімідазоли; ацетофенони; етилу ціаноацетат; ацетат амонію; 4-(4-хлороімідазол-5-іл)піридин-3-карбонітрили; циклоконденсація; антимікробна та протигрибкова активність

Запропоновано синтетичний підхід до отримання ряду нових 4-імідазолілзаміщених похідних нітрилів піридин-3-карбонових кислот і вивчені їх антимікробні та протигрибкові властивості. Встановлено, що 4-(4-хлоро-1Н-імідазол-5-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрили отримують із виходами 41-51% чотирикомпонентною циклоконденсацією 4-хлороімідазол-5-карбальдегідів із ацетофенонами та етилу ціаноацетатом у присутності 10-кратного надлишку ацетату амонію при 15-30 годинному кип'ятінні в етанолі. Детальний моніторинг перебігу реакції методом хроматомас-спектрометрії показав, що реакція супроводжується побічним процесом утворення відповідних халконів, не схильних циклізуватися у цільові продукти. Структура синтезованих сполук доведена комплексом фізико-хімічних методів: ІЧ-, ЯМР ^1H і ^{13}C спектроскопією та хроматомас-спектрометрією. Серед них найдоказовішими є спектри ЯМР ^{13}C з характерними сигналами піридонової системи в діапазонах: C^3 (90-92 м.ч.), C^5 (115-116 м.ч.), C^4 (127-129 м.ч.), C^6 (144-146 м.ч.) та C^2 (159-161 м.ч.). Результати досліджень бактерицидної активності низки синтезованих сполук переконливо підтвердили їх високу антимікробну та протигрибкову дію. Вони пригнічують розвиток вегетативних форм мікроорганізмів у концентраціях 7,8-125 мкг/мл.

THE SYNTHESIS AND EVALUATION OF THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF 4-(4-CHLORO-1H-IMIDAZOL-5-YL)-2-OXO-1,2-DIHYDROPYRIDIN-3-CARBONITRILES

O. Ya. Mel'nyk, V. O. Chornous, N. D. Yakovychuk, N. V. Mel'nichenko, M. V. Vovk

Key words: 5-formyl-4-chloroimidazoles; acetophenones; ethyl cyanoacetate; ammonium acetate; 4-(4-chloroimidazol-5-yl)pyridin-3-carbonitriles; cyclocondensation; antimicrobial and fungicidal activity

The synthetic approach to preparation of some new 4-imidazolyl substituted derivatives of pyridine-3-carboxylic acid nitriles has been proposed, and their antimicrobial and antifungal properties have been studied in the article. It has been found that 4-(4-chloro-1H-imidazol-5-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-carbonitriles are prepared with 41-51% yields by four component cyclocondensation of 4-chloroimidazol-5-carbaldehydes with acetophenones and ethyl cyanoacetate in the presence of the 10-fold excess of ammonium acetate when boiling in ethanol for 15-30 h. A detailed monitoring of the reaction by liquid chromatography-mass spectrometry has shown that the reaction is accompanied with the by-process forming the corresponding chalcones that do not tend to undergo cyclization to the target products. The structure of the compounds synthesized has been proven by the complex of physical and chemical methods: IR, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. The most evidential among them are ^{13}C NMR spectra with characteristic signals for the pyridone system in such ranges as C^3 (90-92 ppm), C^5 (115-116 ppm), C^4 (127-129 ppm), C^6 (144-146 ppm) and C^2 (159-161 ppm). The results of the bactericidal activity study of a number of the compounds synthesized have convincingly confirmed their high antimicrobial and antifungal action. They inhibit the growth of microorganism vegetative forms in the concentrations of 7.8-125 mg/ml.

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ 4-(4-ХЛОРО-1Н-ИМИДАЗОЛ-5-ИЛ)-2-ОКСО-1,2-ДИГИДРОПИРИДИН-3-КАРБОНИТРИЛОВ

О.Я.Мельник, В.А.Чорноус, Н.Д.Яковичук, Н.В.Мельниченко, М.В.Вовк

Ключевые слова: 5-формил-4-хлоримидазолы; ацетофеноны; этилцианоацетат; ацетат аммония; 4-(4-хлоримидазол-5-ил)пиридин-3-карбонитрилы; циклоконденсация; противомикробная и противогрибковая активность

Предложен синтетический подход к получению ряда новых 4-имидазолілзамещенных производных нитрилов пиридин-3-карбоновых кислот и изучены их противомикробные и противогрибковые свойства. Установлено, что 4-(4-хлоро-1Н-имидазол-5-ил)-2-оксо-1,2-дигидро-пиридин-3-карбонитрилы получают с выходами 41-51% четырехкомпонентной циклоконденсацией 4-хлоримидазол-5-карбальдегидов из ацетофенонами и этилцианоацетатом в присутствии 10-кратного избытка ацетата аммония при 15-30 часовом кипячении в этаноле. Подробный мониторинг хода реакции методом хроматомасс-спектрометрии показал, что реакция сопровождается побочным процессом образования соответствующих халконов, которые не склонны подвергаться циклизации в целевые продукты. Структура синтезированных соединений доказана комплексом физико-химических методов: ИК-, ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопией и хроматомасс-спектрометрией. Среди них наиболее доказательными являются спектры ЯМР ^{13}C с характерными сигналами пиридоновой системы в диапазонах: C^3 (90-92 м.д.), C^5 (115-116 м.д.), C^4 (127-129 м.д.), C^6 (144-146 м.д.) и C^2 (159-161 м.д.). Результаты исследований бактерицидной активности ряда синтезированных соединений убедительно подтвердили их высокое противомикробное и противогрибковое действие. Они подавляют развитие вегетативных форм микроорганизмов в концентрациях 7,8-125 мкг/мл.

Серед різноманітних похідних піридину, які відзначаються різнобічними біологічними властивостями, особлива роль належить 4,6-дизаміщеним 3-ціано-2-піридонам [1]. Сполуки цього типу характеризуються широким діапазоном хемотерапевтичної дії: антифібролітичної [2], протипухлинної [3, 4], протималарійної [5], кардіотонічної [6], бактерицидної [6, 7]. Не менш важливим є використання 3-ціано-2-піридонових скафолдів для дизайну на їх основі потенційно біоактивних конденсованих [8-11] та гібридних [12, 13] структур. Розроблені на теперішній час синтетичні підходи до 3-ціано-2-піридонів зазвичай стосуються їх 4,6-діарилзаміщених похідних і базується на багатокомпонентній конденсації ароматичних альдегідів, ацетофенонів, етилу ціаноацетату та ацетату амонію або ціаноацетаміду [3, 5, 14-18]. Їх 4-гетерильні аналоги обмежені прикладами сполук із фурильним [4], тінільним [4, 15], пірольним [19] та піразольним [7, 8] замісниками. З урахуванням нещодавно виявленого впливу природи альдегіду на перебіг такого типу циклоконденсацій [5], а також замісника в положенні 4 піридонових систем на деякі види біоактивності [4] доцільним видавався синтез їх нових представників із фармакофорним 4-хлороімідазольним фрагментом [20] як цікавих об'єктів для біомедичного скринінгу. Саме тому в ролі альдегідної складової в досліджуваній мультикомпонентній реакції були випробувані 5-форміл-4-хлороімідазоли **1a-g** [21, 22].

Встановлено, що альдегіди **1a-g** реагують із ацетофенонами **2a-f** і етилу ціаноацетатом у співвідношенні 1:1.2:1.2 в присутності 10-кратного надлишку ацетату амонію при довготривалому (впродовж 15-30 год) кип'ятінні в етанолі з утворенням 4-(4-хлороімідазол-5-іл)-2-оксо-1,2-дигідро-3-піридин-3-карбонітрилів **3a-h** із виходами 41-51%.

Відомо [15, 16], що подібного типу реакції, як правило, реалізуються через первинне утворення продуктів конденсації альдегіду із етилу ціаноацетатом або ацетофеноном, кожен із яких під дією іншої метиленактивної компоненти у присутності ацетату амонію циклізується до однієї і тієї ж цільової сполуки. Детальний моніторинг перебігу реакції альдегіду **1a** із ацетофеноном **2a**, етилу ціаноацетатом і ацетатом амонію методом хроматомас-спектрометрії показав, що через 8 год нагрівання в реакційній суміші поряд із вихідними реагентами і продуктом реакції **3a** міститься халкон **4a**, який після закінчення процесу був виділений із виходом 23%. Отриманий результат є свідченням того, що формування піридонового циклу найвірогідніше здійснюється через стадію проміжних акриламідів **A**, взаємодія яких із ацетофенонами **2a-f** за Міхаелем і подальша внутрішньомолекулярна циклоконденсація приводить до цільових сполук **3a-h** (табл. 1).

Найбільш достовірно, що 4-хлороімідазольний замісник за рахунок просторових параметрів (наявність у положенні 1 арильних фрагментів, а в положенні 4 атомів хлору) знижує електрофільність первинних продуктів конденсації **A** та **4**, хоча для проміжних сполук **A** внаслідок впливу акцепторних ціано- і карбамоїльної груп вона залишається достатньою для подальшого приєднання в умовах реакції ацетофенону.

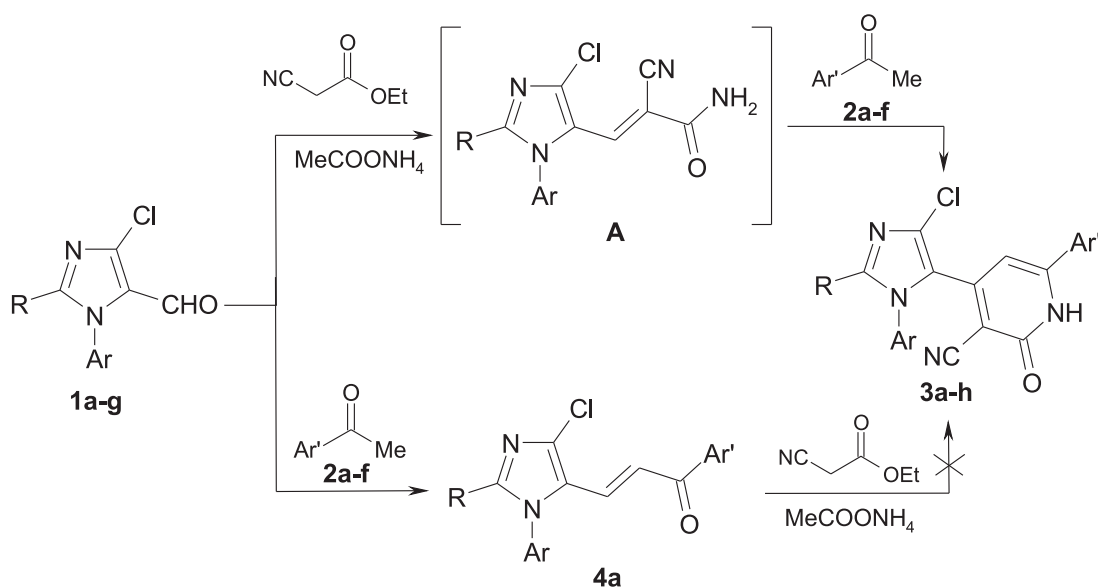
Формування в дослідженій конденсації поліфункціонального піридинового циклу підтверджено комплексом спектральних даних (табл. 2, 3). Зокрема, в ІЧ-спектрах містяться смуги поглинання груп C=O (1646-1655 см⁻¹), C≡N (2225-2234 см⁻¹) та N–H (3386-3395 см⁻¹). Спектри ЯМР ¹H характеризуються синглетами протонів H⁵ при 6.40-6.66 м.ч. та N–H при 12.53-13.07 м.ч. У спектрах ЯМР ¹³C наявні сигнали піридонової системи в діапазонах: C³(90-92 м.ч.), C⁵(115-116 м.ч.), C⁴(127-129 м.ч.), C⁶(144-146 м.ч.) та C²(159-161 м.ч.).

Результати досліджень антимікробної та протигрибкової активності (табл. 4) переконливо підтвердили, що сполуки **3a,c,d,f-h** виявляють високу бактерицидну дію на тест культури бакте-

Таблиця 1

Виходи, температури плавлення, мас-спектри та результати елементного аналізу синтезованих сполук **3a-h**

Сполука	Вихід, %	Т. пл., °C	[M+1] ⁺	Знайдено, %			Формула	Вирахувано, %		
				C	H	N		C	H	N
3a	44	250-253	408	62.24	2.81	13.51	C ₂₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O	61.93	2.97	13.76
3b	51	259-261	455	60.49	3.04	12.51	C ₂₃ H ₁₄ ClF ₃ N ₄ O	60.74	3.10	12.32
3c	41	>270	403	65.36	3.84	14.07	C ₂₂ H ₁₅ ClN ₄ O ₂	65.60	3.75	13.91
3d	48	260-263	422	62.92	3.54	13.09	C ₂₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O	62.72	3.35	13.30
3e	43	254-256	437	71.71	4.06	12.61	C ₂₆ H ₁₇ ClN ₄ O	71.48	3.92	12.82
3f	46	>270	408	62.20	3.14	13.87	C ₂₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O	61.93	2.97	13.76
3g	42	259-261	426	59.14	2.83	12.92	C ₂₁ H ₁₁ Cl ₂ FN ₄ O	59.31	2.61	13.17
3h	47	251-254	456	57.90	2.97	13.53	C ₂₂ H ₁₃ Cl ₂ FN ₄ O ₂	58.04	2.88	12.31



- 1, R=H, Ar=4-ClC₆H₄(a), 2-MeC₆H₄(b), 3-MeC₆H₄(c), 4-MeC₆H₄(d), 1-C₁₀H₇(e); R=Cl, Ar=Ph(f), 4-FC₆H₄(g);
 2, Ar'=Ph(a), 4-ClC₆H₄(b), 4-MeC₆H₄(c), 4-CF₃C₆H₄(d), 4-HOC₆H₄(e), 4-CH₃OC₆H₄(f);
 3, R=H, Ar=4-ClC₆H₄, Ar'=Ph(a); Ar=2-MeC₆H₄, Ar'=4-CF₃C₆H₄(b); Ar=3-MeC₆H₄, Ar'=4-HOC₆H₄(c); Ar=4-MeC₆H₄, Ar'=4-CF₃C₆H₄(d); Ar=1-C₁₀H₇, Ar'=4-MeC₆H₄(e); R=Cl, Ar=Ar'=Ph(f); Ar=4-FC₆H₄, Ar'=Ph(g), 4-CH₃OC₆H₄(h).

Схема

рій *S. aureus* 25923, *E. faecalis* 6783, *E. coli* 25922, *B. Subtilis* P. aeruginosa 27853 та грибів *C. albicans* 815. Вони пригнічують розвиток вегетативних форм мікроорганізмів у концентраціях 7,8-125 мкг/мл, що співрозмірно, а у деяких випадках навіть вище за бактерицидний ефект використаного в ролі тест-об'єкту антибіотика Лораксону. При цьому сполуки **3a,c,d**, які не містять атомів хлору в положенні 2 імідазольного замісника, виявились найактивнішими по відношенню до штамів *B. subtilis*. Їхня мінімальна бактериостатична концентрація знаходилась у діапазоні 7,8-31,3 мкг/мл. Скринінг протигрибкових властивостей досліджених сполук по відношенню до *C. albicans* 815 показав, що всі вони є активними у концентраціях 15,6-

62,5 мкг/мл, хоча їх виражена фунгіцидна дія проявляється у двічі вищих концентраціях. Таким чином, отримані біологічні характеристики 4-імідазолівмісних 2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилів дозволяють стверджувати про перспективність їх подальших поглиблених досліджень з метою пошуку нових ефективних бактерицидних препаратів.

Експериментальна хімічна частина

ІЧ-спектри синтезованих сполук записані на спектрофотометрі Bruker Vertex 70 в табл. КВр. Спектри ЯМР ¹H та ¹³C в розчинах DMSO-d₆ зареєстровані на спектрометрі Varian VXR-400 (399.97 і 125.74 МГц відповідно), внутрішній стандарт –

Таблиця 2

ІЧ- та ЯМР ¹H спектри сполук **3a-h**

Сполука	ІЧ-спектр, KBr, ν, см ⁻¹			Спектри ЯМР ¹ H, δ, м.ч.
	C=C	C≡N	N-H	
3a	1652	2229	3394	6.57 с (1H, H ⁵ піридин), 7.42-7.63 м (9H _{аром.}), 8.33 с (H ² _{імідазол}), 12.98 с (1H, NH)
3b	1649	2233	3390	2.06 с (3H, CH ₃), 6.64 с (1H, H ⁵ піридин), 7.39-7.87 м (8H _{аром.}), 8.21 с (H ² _{імідазол}), 13.07 с (1H, NH)
3c	1655	2230	3393	2.31 с (3H, CH ₃), 6.43 с (1H, H ⁵ піридин), 6.82 г (2H _{аром.} , J 7.8 Гц), 7.10-7.49 м (7H _{аром.}), 8.23 с (1H, H ² _{імідазол}), 10.28 ш. с (1H, OH), 12.67 ш. с (1H, NH)
3d	1651	2227	3395	2.35 с (3H, CH ₃), 6.66 с (1H, H ⁵ піридин), 7.23-7.28 м (4H _{аром.}), 7.55-7.65 м (4H _{аром.}), 8.27 с (1H, H ² _{імідазол}), 13.03 с (1H, NH)
3e	1646	2234	3390	2.21 с (3H, CH ₃), 6.40 с (1H, H ⁵ піридин), 7.19-8.09 м (11H _{аром.}), 8.28 с (1H, H ² _{імідазол}), 12.53 с (1H, NH)
3f	1650	2225	3388	6.50 с (1H, H ⁵ піридин), 7.44-7.57 м (10H _{аром.}), 12.97 с (1H, NH)
3g	1648	2229	3391	6.57 с (1H, H ⁵ піридин), 7.22-7.53 м (9H _{аром.}), 12.93 с (1H, NH)
3h	1653	2232	3386	3.81 с (3H, CH ₃ O), 6.45 с (1H, H ⁵ піридин), 7.02 г (2H _{аром.}), 7.49-7.58 м (7H _{аром.}), 12.82 ш.с (1H, NH)

Таблиця 3

Спектри ЯМР ^{13}C сполук **3a-h**

Сполука	δ , м.ч.										Ar, Ar'
	C^3 піридин	$\text{C}\equiv\text{N}$	C^5 піридин	C^4 піридин	C^5 імідазол	C^4 імідазол	C^2 імідазол	C^6 піридин	C^2 піридин		
3a	90.88	115.26	116.03	127.55	130.75	131.49	139.19	144.01	159.82		121.83, 125.73, 126.86, 128.31, 129.02, 129.73, 133.43, 133.95
3b	92.17	115.41	115.63	128.17	130.18	131.05	139.68	145.78	159.63		20.74, 122.68, 122.85, 123.47 (CF_3 , $J_{\text{C-F}}$ 253.20 Гц), 124.84, 125.72, 126.90, 128.32, 130.79, 132.26, 134.66
3c	90.21	115.59	115.73	129.32	130.23	132.12	138.74	145.33	160.35		20.55, 122.17, 123.45, 124.59, 125.57, 125.89, 126.81, 129.32, 130.65, 135.11, 161.49
3d	91.25	115.13	116.31	128.35	130.33	132.65	138.89	144.72	160.13		121.83, 124.83, 128.96, 129.42, 129.77, 130.07, 136.27, 138.65
3e	92.44	115.41	115.53	128.47	130.39	131.26	140.39	145.29	160.53		120.83, 124.19, 125.32, 126.59, 126.97, 127.21, 128.63, 129.31, 129.50, 131.88, 132.04, 133.42, 134.51, 141.67
3f	90.30	115.06	116.20	128.36	130.28	133.30	135.47	145.30	161.27		124.27, 125.89, 127.27, 127.77, 128.99, 129.71, 131.36, 133.62
3g	90.47	115.04	115.49	129.88	131.05	133.31	136.53	144.88	160.31		121.43, 122.57, 125.36, 127.30, 128.93, 130.20, 131.53, 162.44 г ($J_{\text{C-F}}$ 282.5 Гц)
3h	92.18	115.34	115.88	129.07	130.49	133.21	135.43	146.70	161.86		58.44, 123.52, 124.14, 125.43, 127.69, 128.25, 129.69, 133.68, 160.51

ТМС. Хроматомас-спектри отримані на приладі Agilent 1100/DAD/HSD/V-G 119562.

4-(1-Арил-4-хлоро-1H-імідазол-5-іл)-2-оксо-6-арил-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрили (3a-h). Суміш 2 ммоль 4-хлоро-5-формілімідазолу **1a-g**, 2,4 ммоль ацетофенону **2a-f**, 0,27 г (2,4 ммоль) етилу ціаноацетату та 1,54 г (20 ммоль) ацетату амонію в 25 мл етанолу кип'ятили впродовж 15 год (сполуки **1a, f, g**), 18 год (сполука **1b**), 20 год (сполука **1c**), 26 год (сполука **1e**) та 30 год (сполука **1d**). Утворений осад (сполуки **3a, d-h**) відфільтровували, промивали етанолом і висушували

ли на повітрі. Фільтрат після відділення сполуки **3a** упарювали, до залишку додавали 7 мл етилацетату, осад відфільтровували і кристалізували з етанолу. Отримували сполуку **4a**. Вихід – 23%. Т. пл. – 227-229°C [23].

Для сполук **3b, c** реакційну суміш упарювали, до залишку додавали 10 мл ацетонітрилу, утворений осад відфільтровували і висушували на повітрі.

Експериментальна біологічна частина

Антимікробну та протигрибкову активність визначали мікрометодом дворазових серійних роз-

Таблиця 4

Антимікробна та протигрибкова активність сполук **3a,c,d, f-h**

Сполука	Тест-культури мікроорганізмів											
	S. aureus 25923		E. faecalis 6783		E. coli 25922		B. subtilis		P. aeruginosa 27853		C. albicans 815	
	Концентрація препаратів (мкг/мл)											
	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБсК	МФсК	МФцК
3a	62.5	125	62.5	125	62.5	125	15.6	31.3	31.3	62.5	31.3	62.5
3c	62.5	125	62.5	125	31.3	62.5	31.3	62.5	62.5	125	15.6	31.3
3d	62.5	125	62.5	125	62.5	125	7.8	15.6	62.5	125	31.3	62.5
3f	62.5	125	62.5	125	62.5	125	31.3	62.5	62.5	125	31.3	62.5
3g	62.5	125	62.5	125	62.5	125	31.3	62.5	62.5	125	62.5	125
3h	62.5	125	125	250	62.5	125	125	250	125	250	31.3	62.5
Лораксон	62.5	125	62.5	125	62.5	125	62.5	125	125	250	-	-

ведень в одноразових полістиролових 96-лункових планшетах із використанням 8-канального титратора [24]. Як тест-культури мікроорганізмів використовували клінічні штами бактерій *S. aureus* 25923, *E. faecalis* 6783, *E. coli* 25922, *B. Subtilis* *P. aeruginosa* 27853 та грибів *C. albicans* 815, які часто викликають інвазивні процеси в організмі людини. Чисті культури бактерій інкубували впродовж 24 год у м'ясо-пептонному бульйоні при температурі $37 \pm 1^\circ\text{C}$, отримували суспензію бактеріальних клітин до кінцевої кількості 10^5 КУО/мл. Виділену чисту культуру *C. albicans* 815 культивували на поживному агарі Сабуро при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ до 7 діб, отримували суспензію грибкових клітин у бульйоні Сабуро до кінцевої кількості 10^5 КУО/мл. Концентрацію доводили відповідно до 0.5 стандарту McFarlang за візуальним контролем.

Із досліджуваних сполук готували дворазові серійні розведення (від 500 мкг/мл до 7,8 мкг/мл).

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації сполук стосовно бактерій оцінювали через 24 год інкубації, а щодо грибів *C. albicans* 815 – через 48-72 год. Мінімальну бактеріостатичну концентрацію (МБСК) і мінімальну фунгістатичну концентрацію (МФСК) оцінювали за найменшим розведенням сполуки, за наявності якої відбувалось пригнічення росту тест-культури мікроорганізму.

Висновки

1. Циклоконденсацією 4-хлороімідазол-5-карбальдегідів із ацетофенонами, етилу ціаноацетатом та ацетатом амонію синтезовані нові 4-(4-хлороімідазол-5-іл)заміщені похідні 2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилів.

2. Біотестування низки синтезованих сполук виявило їх високу антимікробну та протигрибкову активність.

Література

1. Mekillor A., Boulton A. J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Eds A. R. Katritzky, C. W. Rees, Pergamon, Oxford, 1984, Vol. 2, pp.67-98.
2. Ismail M. M. F., Noaman E. *Medicinal Chemistry Research*, 2005, Vol. 14, No.7, pp.382-403.
3. Abadi A. H., Abouel-Ella D. A., Lehmann J., Tinsley H. N., Gary B. D., Piazza G. A., Abdel Fattah M. A. O. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, Vol. 45, pp.90-97.
4. Cheney I. W., Yan S., Appleby T., Walker H., Vo T., Yao N., Hamatake R., Hong Z., Wu J. Z. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2007, Vol. 17, pp.1679-1683.
5. Bekhit A. A., Hymete A., Damtew A., Mohamed A. M. I., Bekhit A. E. A. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2012, Vol. 27, pp.69-77.
6. Bekhit A. A., Baraca A. M. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, Vol. 40, pp.69-77.
7. Abd El Salam H. A., Shaker N. O., WI-Telbani E. H., Nawwar G. A. M. *Journal of Chemical Reserch*, 2009, Vol. 6, pp.400-404.
8. El-Emary T. I., Bakhite E. A. *Pharmazie*, 1999, Vol. 54, No.2, pp.106-111.
9. Al-Issa S. A. R. *Molecules*, 2012, Vol. 17, pp.10902-10915.
10. Atmekur K., Emmadi N. R., Balasubramanian S. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2013, Vol. 50, pp.513-518.
11. Chavva K., Pillalamarri S., Banda V., Gautham S., Gaddamedi J., Yedla P., Kumar C. G., Banda N. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013, Vol. 23, pp.5893-5895.
12. Abdou J. M., Rateb N. M., Eldead H. A. *Heterocyclic Communications*, 2012, Vol. 18, pp.135-141.
13. Raju K., Chandra S. A., Sathaiyah G., Ravi K. A., Narsaiyah B., Shanthan R. P., Srujana R., Srigiridhar K. *Letters in Organic Chemistry*, 2014, Vol. 11, No.4, pp.293-302.
14. Rong L., Han H., Jiang H., Shi D., Tu. *Synthetic Communications*, 2008, Vol. 38, pp.217-224.
15. Zayed S. M. A. D., Attia A. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1983, Vol. 20, pp.129-131.
16. Michael M. A., Becher J., Winckelmann I. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1983, Vol. 20, pp.1651-1656.
17. El-Sayed H. A., Ouf N. H., Moustafa A. H. *Research of Chemical Intermediates*, 2014, Vol. 40, pp.407-412.
18. Nalage S. V., Nikum A. P., Kalyankar M. B., Patil V. S., Patil U. D., Desale K. R., Patil S. L., Bhosale S. V. *Letters in Organic Chemistry*, 2010, Vol. 7, pp.406-410.
19. Rostom S. A. F., Bekhit A. A. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, Vol. 92, pp.712-722.
20. Chornous V. O., Grozav A. M., Vovk M. V. *Khimiya i biologicheskaya aktivnost azolov*. Eds. V. Brovarets, V. Zyabrev. LAP Lambert Acad. Publ., 2014, pp.75-101.
21. Chornous V. A., Bratenko M. K., Vovk M. V. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2009, Vol. 45, pp.1210-1213.
22. Chornous V. A., Grozav A. M., Rusanov E. B., Nesterenko A. M., Vovk M. V. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2011, Vol. 47, pp.702-709.
23. Chornous V. O., Melnyk O. Ya, Kutsyk R. V., Vovk M. V. *Naukovyy Visnyk Chernivets'kogo universytetu, Khimiya*, 2014, Vol. 683, pp.90-96.
24. Labinskaya A. S., Blinkova L. P., Eshhina A. S. *Obschaya i sanitarnaya microbiologiya s tekhnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij*. Moscow, Meditsina, 2010.

Надійшла до редакції 22.09.2015 р.

UDC 615.22:615.453.6:543.544.5.068.7:543.05

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES IN RIBOXIN TABLETS

M.V.Rosada, N.Yu.Bevz, V.A.Georgiyants

National University of Pharmacy
53, Pushkinska Str., 61002, Kharkiv. E-mail: rosada@list.ru*Key words: standardization; Riboxin; tablets; related impurities; HPLC*

Riboxin (inosine) is used in medicine for treating cardiovascular diseases, so the number of dosage forms containing this substance as an active ingredient is constantly increasing at the Ukrainian pharmaceutical market. When developing quality control methods for a dosage form containing one active substance it is advisable to carry out tests on the presence of related impurities besides identification and assay tests. The article presents the data concerning development of the method for determination of related impurities (hypoxanthine, guanosine) in riboxine tablets using HPLC. The analysis was carried out using a HPLC column (125×4 mm i.d., 5 μm particles) filled with "Lichrospher 60 RP select B" sorbent. The mobile phase adjusted with the phosphate buffer to pH 3.5 was used. The UV detection was performed at 250 nm. The validation characteristics have been studied using the acceptance criteria for the tolerances of the content not more than 0.5% for each impurity, and they confirm specificity (the absence of the effect of excipients), linearity, precision (convergence), accuracy ($\Delta_z = 0.79 \leq \max \Delta_z = 5.0$, $\delta = 0.21 \leq \max \delta = 0.26$, $a = 0.48$, $r = 0.99997 > 0.9976$ for hypoxanthine, and $\Delta_z = 0.83 \leq \max \Delta_z = 5.0$, $\delta = 0.17 \leq \max \delta = 0.28$, $a = 0.21$, $r = 0.99997 > 0.9976$ for guanosine), and the application range for the method proposed.

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК У ТАБЛЕТКАХ РИБОКСИН **М.В.Росада, Н.Ю.Бевз, В.А.Георгіянти**

Ключові слова: стандартизація; рибоксин; таблетки; супровідні домішки; метод ВЕРХ

Рибоксин (інозин) застосовують у медичній практиці для лікування серцево-судинних захворювань, тому кількість готових лікарських форм, що містять як активний фармацевтичний інгредієнт саме цю речовину, на фармацевтичному ринку України постійно зростає. При розробці методик контролю якості на готову лікарську форму, що містить одну діючу речовину, доцільно окрім випробувань на ідентифікацію та кількісне визначення також проводити випробування на вміст супутніх домішок. У запропонованій роботі наводяться дані по розробці методики визначення супровідних домішок (гіпоксантин, гуанозин) рибоксину в таблетках з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії. Визначення проводили на колонці розміром 125×4 мм, заповненій сорбентом «Lichrospher 60 RP select B» з розміром часток 5 мкм, використовували рухома фаза на основі фосфатного буферного розчину з рН 3,5 та УФ-детектування за довжини хвилі 250 нм. Вивчені валідаційні характеристики з використанням критерієв прийнятності для допусків вмісту не більше 0,5% для кожної з домішок підтверджують специфічність (відсутність впливу допоміжних речовин), лінійність, прецизійність (збіжність), правильність ($\Delta_z = 0.79 \leq \max \Delta_z = 5.0$, $\delta = 0.21 \leq \max \delta = 0.26$, $a = 0.48$, $r = 0.99997 > 0.9976$ гіпоксантину та $\Delta_z = 0.83 \leq \max \Delta_z = 5.0$, $\delta = 0.17 \leq \max \delta = 0.28$, $a = 0.21$, $r = 0.99997 > 0.9976$ гуанозину) та діапазон застосування запропонованої методики.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В ТАБЛЕТКАХ РИБОКСИН

Н.В.Росада, Н.Ю.Бевз, В.А.Георгіянти

Ключевые слова: стандартизація; рибоксин; таблетки; супутствующіе примеси; метод ВЭЖХ

Рибоксин (інозин) використовують в медичній практиці для лікування серцево-судинних захворювань, тому кількість готових лікарських форм, що містять як активний фармацевтичний інгредієнт саме цю речовину, на фармацевтичному ринку України постійно зростає. При розробці методик контролю якості на готову лікарську форму, що містить одну діючу речовину, доцільно окрім випробувань на ідентифікацію та кількісне визначення також проводити випробування на вміст супутніх домішок. У запропонованій роботі наводяться дані по розробці методики визначення супровідних домішок (гіпоксантин, гуанозин) рибоксину в таблетках з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії. Визначення проводили на колонці розміром 125×4 мм, заповненій сорбентом «Lichrospher 60 RP select B» з розміром часток 5 мкм, використовували рухома фаза на основі фосфатного буферного розчину з рН 3,5 та УФ-детектування за довжини хвилі 250 нм. Вивчені валідаційні характеристики з використанням критерієв прийнятності для допусків вмісту не більше 0,5% для кожної з домішок підтверджують специфічність (відсутність впливу допоміжних речовин), лінійність, прецизійність (збіжність), правильність ($\Delta_z = 0.79 \leq \max \Delta_z = 5.0$, $\delta = 0.21 \leq \max \delta = 0.26$, $a = 0.48$, $r = 0.99997 > 0.9976$ гіпоксантину та $\Delta_z = 0.83 \leq \max \Delta_z = 5.0$, $\delta = 0.17 \leq \max \delta = 0.28$, $a = 0.21$, $r = 0.99997 > 0.9976$ гуанозину) та діапазон застосування запропонованої методики.

Riboxin is used for improvement of the functional recovery after craniocerebral traumas; it affects restoration of the level of the associated protein GAP-43 growth in the hippocampus [1], and has good indications for treating patients suffered a stroke [2]. Recently, a lot of dosage forms containing riboxin appear at the domestic pharmaceutical market. The State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) recommends to determine related impurities both in dosage forms and in substances.

The inosine substance is obtained by microbiological synthesis, and hypoxanthine and guanosine can be by-products of this synthesis [3]. Their certain amount (not more than 0.5%) is regulated in the substance [4, 5, 6]. For the further substantiation for either inclusion or exclusion of impurities in the specification it is advisable to determine these related impurities in the finished dosage form.

Nowadays, there are three requirements for drug substances and medicines: efficacy, safety, and quality. Recently, in drug quality control the attention is paid to determination of related impurities [7, 8, 9], which may have a significant impact on the human health due to potential teratogenic, mutagenic or carcinogenic effects. Therefore, control and monitoring of impurities is a pressing question when developing and producing drugs. In accordance with the Pharmacopoeia of the People's Republic of China [5], the manufacturer [4] and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation [6] the HPLC method is used for the assay of riboxin and determination of related impurities. The equipment change and technological peculiarities of tablet production need improvement of the existing method or development of the new one.

The aim of our research was to develop the method for determination of related impurities in riboxin tablets by HPLC, and validate it in accordance with the SPhU requirements to drugs in the form of tablets [10, 11, 12].

The study object was "Riboxin" tablets with the content of 200 mg of the active substance (excipients – potato starch, sugar, hypromellose, sodium croscarmellose, povidone K25 and magnesium stearate). The

reference samples of 9- β -D-ribofuranosyl hypoxanthine (riboxin (inosine), batch 1 from 20.04.2012 (RS, SPhU)); guanine-9- β -hypoxanthine (guanosine), batch 0B006736 from 09.08.2010; 6-hydroxypurine (hypoxanthine), batch 0L006460 from 09.07.2010 were used. Analytical studies were performed by the HPLC method on an Agilent 1200 chromatograph ("Agilent Technologies", Germany) using OHAUS AP 250D laboratory balances ("Ohaus Corporation", USA), and the measuring glassware of class A.

Determination of related impurities of riboxin in tablets was carried out by the HPLC method. To determine related impurities in the test solution the diluted solution of riboxin impurities was used as the reference solution. Since the method for determination of related impurities must be validated according to the SPhU requirements, the main validation characteristics were studied: specificity, linearity, precision (convergence), accuracy, and the application range.

The tolerances of the content of related impurities of riboxin in the finished dosage form is not more than 0.5%. Therefore, during validation the parameters for $B = 0.5\%$, i.e. the maximum uncertainty of the analysis (Δ_{As}) must be not more than 5.0%, were the evaluation criteria of this method [8, 13, 14, 15].

The specificity of the method is confirmed by the absence of the effect of excipients. The chromatogram of the placebo solution shows it (Fig. 1).

The suitability of the chromatographic system is performed since the peaks of related substances (hypoxanthine and guanosine) and the peak of the basic substance (riboxin) are completely separated (Fig. 2).

The linearity, precision, accuracy, and the application range of the given method were determined on the model mixtures with the known content of related impurities in the range from 25% to 125% relative to the maximum permissible value. Both the reference solution and model solutions were prepared according to the same method; the actual values X_i from the ratio of $X = S_i/S_{st} \cdot 100\%$ were equal in relation to the actual weights of the riboxin substance taken for preparation of the model solution and the

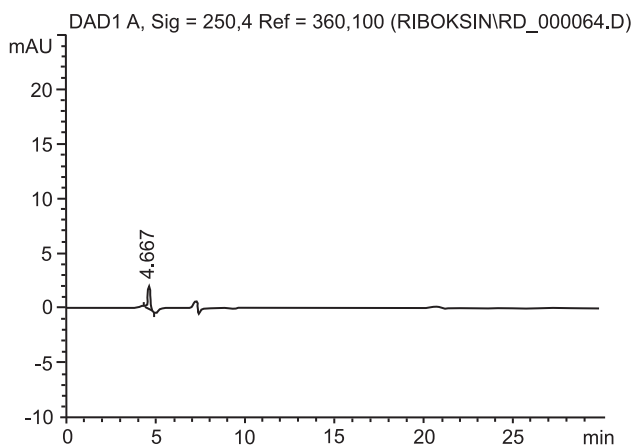


Fig. 1. The chromatogram of the placebo solution.

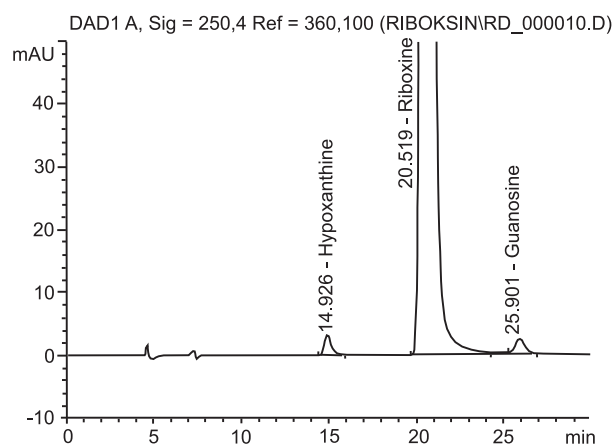


Fig. 2. The chromatogram of the chromatographic system suitability.

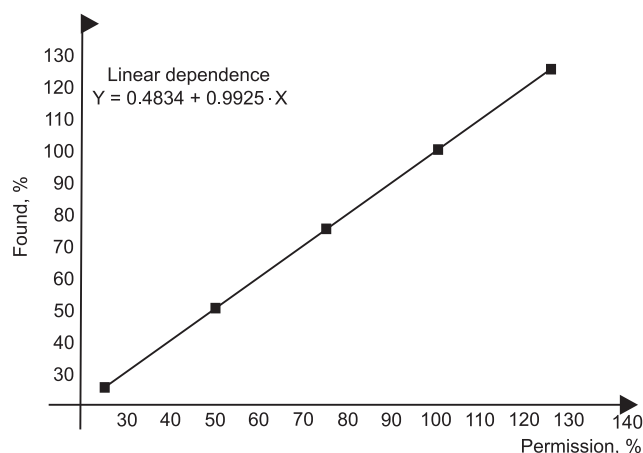


Fig. 3. The linear dependence of the peak area on the hypoxanthine concentration.

reference solution. The working concentration of the test solution and the reference solution was approximately 10 $\mu\text{g/ml}$. The linearity of dependence of the peak areas of hypoxanthine and guanosine solutions on the concentration in the range of approximately 2.5 $\mu\text{g/ml}$ to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ was determined. The linear dependence of the peak area on the concentration of related impurities of hypoxanthine and guanosine in the normalized coordinates is presented in Fig. 3 and Fig. 4, respectively.

Calculation of parameters of the linear dependence $Y_i = b \cdot X_i + a$ for related impurities of riboxin (hypoxanthine and guanosine) was performed by the least squares method (Tab. 1).

As can be seen from Table 1, all requirements for the linear dependence parameters are met, i.e. the linearity of the method for determination of related impurities is confirmed within the whole range of concentrations (25-125%). The high value of the correlation coefficient also meets the requirements of the acceptance criteria ($r = 0.9976$) and confirms the linearity of dependence between the “introduced” and “found” amount of the substance.

The data of Tab. 2 and 3 show that for both hypoxanthine and guanosine the method of analysis is characterized by sufficient precision (convergence). The value of

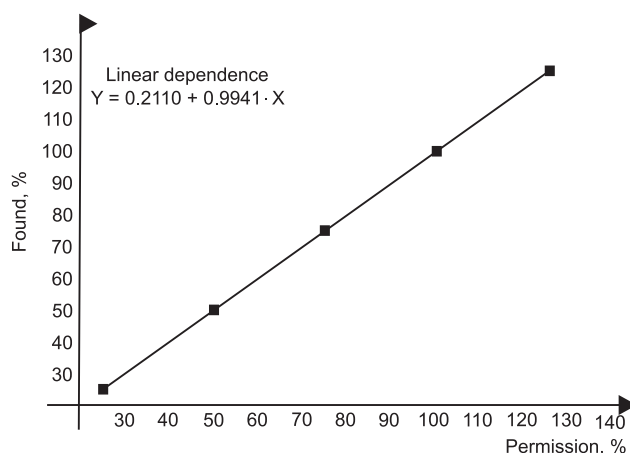


Fig. 4. The linear dependence of the peak area on the guanosine concentration.

the relative confidence interval of value Z found is less than the critical value for convergence of results (5.00%).

The tests for the tablets studied showed that in the chromatograms of the test solution for “Riboxin” drug only one impurity (guanosine) in the amount of approximately 0.12% was determined (Fig. 5).

Therefore, it has been found that the amount of related impurities in “Riboxin” tablets does not increase compared to the riboxin substance, i.e. the impurity identified is the technological impurity of the sub-

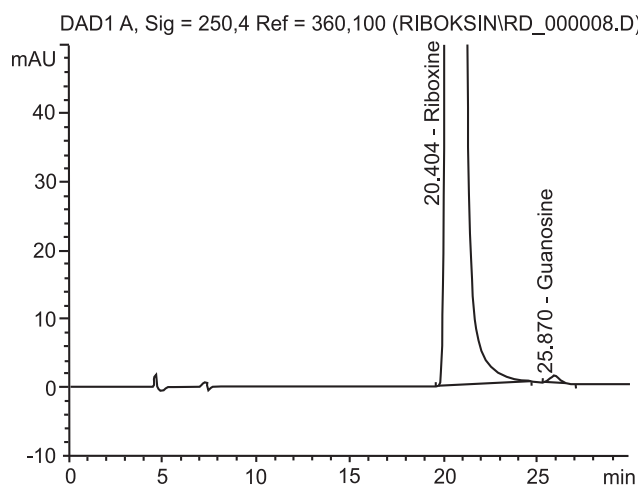


Fig. 5. The chromatogram of the test solution.

Table 1

Metrological characteristics of the linear dependence for riboxin

	b	S_b	a	S_a	S_r	r
Hypoxanthine	0.9925	0.0028	0.4834	0.2252	0.3028	0.99997
Criteria			<1.8946* 0.2252 = 0.43			>0.9976
			<2.1			
Guanosine	0.9941	0.0027	0.2110	0.2191	0.2946	0.99997
Criteria			<1.8946* 0.2191 = 0.42			>0.9976
			<2.1			

Table 2

The results of analysis of the model mixtures and their statistical processing for hypoxanthine determination

No. of the model solution	The sample weight of hypoxanthine RS, mg $m_{st} = 9.9$ mg	Found in % to the introduced ($X_i = C_i/C_{st}$ %)	The area mean values (S_i) ($S_{st} = 259.80$)	Found in % to the concentration of the reference solution ($Y_i = S_i/S_{st}$ %)	Found in % to the introduced $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %
1	2.5	25.25	66.50	25.60	101.39
2	2.5	25.25	66.50	25.60	101.39
3	5.0	50.51	131.50	50.62	100.22
4	5.0	50.51	132.10	50.85	100.67
5	7.5	75.76	195.90	75.40	99.52
6	7.5	75.76	196.50	75.64	99.84
7	10.0	101.01	260.20	100.15	99.15
8	12.5	126.26	327.80	126.17	99.93
9	12.5	126.26	327.20	125.94	99.75
Mean, %					99.59
Relative standard deviation, RSD_z , % $RSD_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \cdot \frac{100}{\bar{Z}}$					0.34
Relative confidence interval, $\Delta_z(\%) = t(95, n-1) \times RSD_z = 1,860 \times RSD_z$, %					0.79
Critical value for convergence of results Δ_{As} , % (limit uncertainty) 5.0					5.0
Systematic error $\delta = \bar{Z} - 100 $					0.21
Criterion of the systematic error insignificance $\delta\% = \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_z}{3} = \frac{0.7924}{3} = 0.26$ (0.21 ≤ 0.26) if not satisfied 1), then $\delta \leq 0.32 \times 5.0 = 1.6\%$ (0.26 ≤ 1.6)					Is not satisfied Satisfied
The overall conclusion of the method					Correct

stance. Due to this fact we consider it is possible to include the limitation for impurities in the specifications for tablets, which is similar to the manufacturer's Analytical Normative Documents for the substance: not more than 0.5% of guanosine and not more than 0.5% of hypoxanthine.

Experimental Part

The method for determination of related impurities:

Test solution. Place approximately 68.7 mg (accurate weight) of the powdered tablets into a 250 ml flask, add 150 ml of water, stir the solution obtained for 10-15 min, or place in an ultrasonic bath for 10 min, and cool. Then dilute the solution to the volume with the same solvent, mix, and filter through a 0.45 microns membrane filter rejecting the first 5 ml of the filtrate.

Reference solution (a). Place 10.0 mg of guanosine into a 100 ml flask, dissolve in warm water, cool, dilute the solution obtained to the volume with the same solvent, and mix.

Reference solution (b). Place 10.0 mg of hypoxanthine into a 100 ml flask, dissolve in warm water,

cool, dilute the solution obtained to the volume with the same solvent, and mix.

Reference solution (c). Place 1.0 ml of the *Reference solution (a)* and 1.0 ml of the *Reference solution (b)* into a 100 ml flask, dilute the solution obtained to the volume with water, and mix.

Reference solution (d). Place 20.0 mg of riboxin into a 100 ml flask, dissolve in water, dilute the solution obtained to the volume with the same solvent, and mix.

Reference solution (e). Mix the *Reference solution (c)* with the *Reference solution (d)*.

Chromatography is carried out in the conditions described below:

- Column – 125×4 mm i.d., filled with “Lichrospher 60 RP select B” sorbent (5 μm particles) or similar, for which the requirements of the “Chromatographic system suitability” test are met;
- The flow rate of the mobile phase – 0.2 ml/min;
- Detection – at the wavelength of 250 nm;
- Column temperature – 35°C.

For chromatography 20 μl of the *Test solution*, the *Reference solution (c)* and the *Reference solution (e)* were used, at least 3 chromatograms should be obtained.

Table 3

The results of analysis of the model mixtures and their statistical processing for guanosine determination

No. of the model solution	The sample weight of guanosine RS, mg $m_{st} = 9.9$ mg	Found in % to the introduced ($X_i = C_i/C_{str}$ %)	The area mean values (S_i) ($S_{st} = 147.70$)	Found in % to the concentration of the reference solution ($Y_i = S_i/S_{str}$ %)	Found in % to the introduced $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %
1	2.5	25.25	37.30	25.25	100.00
2	2.5	25.25	37.50	25.39	100.55
3	5.0	50.51	74.70	50.58	100.14
4	5.0	50.51	74.70	50.58	100.14
5	7.5	75.76	111.40	75.42	99.55
6	7.5	75.76	111.40	75.42	99.55
7	10.0	101.01	147.70	100.00	99.00
8	12.5	126.26	185.90	125.86	99.68
9	12.5	126.26	186.20	126.07	99.85
Mean, %					99.83
Relative standard deviation, RSDz, %					0.45
$RSD_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \cdot \frac{100}{\bar{Z}}$					
Relative confidence interval, $\Delta_z(\%) = t(95, n-1) \times RSD_z = 1.860 \times RSD_z, \%$					0.83
Critical value for convergence of results $\Delta_{Asr}, \%$ (limit uncertainty) 5.0					5.0
Systematic error $\delta = \bar{Z} - 100 $					0.17
Criterion of the systematic error insignificance					Is not satisfied
$\delta\% = \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_z}{3} = \frac{0.8337}{3} = 0.28 (0.17 \leq 0.28) \text{ if not satisfied 1),}$ then $\delta \leq 0.32 \times 5.0 = 1.6\% (0.28 \leq 1.6)$					
The overall conclusion of the method					Correct

The system suitability test: The chromatography system is considered to be suitable if the following conditions are performed:

- resolution of hypoxanthine and riboxin should be at least 4.0;
- resolution of guanosine and riboxin should be at least 2.0.

Preparation of the mobile phase:

Place 4.80 g of potassium dihydrogen phosphate, 0.24 g of sodium heptanesulfonate into a 1000 ml flask, dissolve in 700 ml of water; add 0.20 g of triethylamine and 20 ml of methanol, and mix the solution obtained.

Then, adjust pH to 3.5 with the concentrated phosphoric acid by potentiometry. Dilute the solution obtained to the volume of 1000 ml with water and mix.

Conclusions

1. The method for determination of related impurities has been developed; its suitability has been proven by the HPLC method.

2. The validation study for the "Related impurities" test performed confirms the compliance of such characteristics as specificity, linearity, precision (convergence), accuracy, and the application range with the acceptance criteria.

References

1. Shlomit Dachir, Dalia Shabashov, Victoria Trembovler, Alexander G. Alexandrovich, Larry I. Benowitz, Esther Shohami. *Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury*. *Brain Research*, 2014, No.1555, pp.78-88.
2. Laila Zai, Christina Ferrari, Carlie Dice, Sathish Subbaiah, Leif A. Havton, Giovanni Coppola, Daniel Geschwind, Nina Irwin, Eric Huebner, Stephen M. Strittmatter, Larry I. Benowitz. *Inosine Augments the Effects of a Nogo Receptor Blocker and of Environmental Enrichment to Restore Skilled Forelimb Use after Stroke*. *Journal of Neuroscience*, 2011, No.31, pp.5977-5988.
3. Пат. РФ 1755583 (1994). Заявл.: 31.10.1990. Оpubл. 30.08.1994 [Электронный ресурс] Режим доступа <http://patents.su/0-1755583-sposob-polucheniya-inozina.html>.
4. Drug master file (for Inosine). "Starlake Bioscience Co.", China, 2007, p.68.
5. Китайська фармакопея. Т. 2. People's Medical Publishing House, 2005, pp.438-440.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации Ч. 1. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. РИБОКСИН (ФС 42-0275-07), 2007, с.624-627.

7. Александров А. В. Вызовы и возможности документа ICH Q10 «Фармацевтическая система качества». *Промышленное обозрение*, 2008, №4(9), с.19-21.
8. FDA / *Guidance for Industry-ANDAs: Impurities in Drug Products*. Rockville, MD, 2010, p.7.
9. Jiben Roy. *Pharmaceutical Impurities – A Mini-Review*. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2002, Vol. 3(2), p.7.
10. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Фармаком*, 2006, №1/2, с.3-44.
11. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. X.: PIPEГ, 2001, 556 с.
12. Настанова «Лікарські засоби. Фармацевтична розробка» (Настанова 42-3.1:2004). К.: МОРИОН, 2004, 15 с.
13. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доп. 1. X.: PIPEГ, 2004, 494 с.
14. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доп. 2. X.: PIPEГ, 2008, 617 с.
15. Стандартизованная процедура валидации методик контроля содержания примесей в готовых лекарственных средствах методом жидкостной хроматографии / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Т. Н. Доценко, В. А. Загорий. *Фармаком*, 2005, №2-3, с.78-94.

Надійшла до редакції 12.10.2015 р.

УДК 547.792+547.792-38:547.792-048.62]:543.544:615.31

ВИВЧЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ УТРИМУВАННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ СУБСТАНЦІЙ РЯДУ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛТІОАЦЕТАТНИХ КИСЛОТ ТА ЇХ СОЛЕЙ МЕТОДОМ ВЕРХ/ДМД-МС

Б.О.Варинський, Є.Г.Книш, В.В.Парченко, О.І.Панасенко, А.Г.Каплаушенко

Запорізький державний медичний університет

69035, пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, Україна. E-mail: varinsky@zsmu.zp.ua

Ключові слова: характеристики утримування; 1,2,4-триазол-3-ілтїоацетатні кислоти; ВЕРХ/ДМД-МС

Похідні 1,2,4-триазолу є потенційними лікарськими речовинами з різноманітною біологічною активністю. Контроль стадій отримання таких сполук на дослідному і виробничому етапі є важливим завданням сучасної фармацевтичної науки. Найбільш універсальним і селективним методом, що дозволяє підтвердити структуру як основних речовин, так і домішок та визначити кількісний вміст аналітів, є ВЕРХ/ДМД-МС. Метою дослідження є вивчення залежності параметрів утримування ряду 1,2,4-триазол-3-ілтїоацетатних кислот та їх солей, що є кінцевими продуктами у синтезі зареєстрованих і потенційних лікарських речовин за 8 схемами синтезу, від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі за умов ВЕРХ/ДМД-МС-визначення. Встановлено залежність коефіцієнта ємності k від вмісту ацетонітрилу для ряду 1,2,4-триазол-3-ілтїоацетатних кислот та їх солей. Показані можливості вибору умов хроматографічного визначення цих сполук як окремо, так і в сумішах. Встановлено, що для досліджуваних 1,2,4-триазол-3-ілтїоацетатних кислот до 65% вмісту ацетонітрилу в елюенті спостерігається обернено-фазовий механізм утримування, а потім іонообмінний механізм взаємодії з силанольними групами. Показано експоненційний характер взаємозв'язку між $\log D$ та коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісті ацетонітрилу в складі рухомої фази. Встановлено, що взаємозв'язок між $\log D$ та десятковими логарифмами коефіцієнтів ємності досліджуваних сполук при 15% вмісті ацетонітрилу в складі рухомої фази носить лінійний характер.

THE STUDY OF RETENTION REGULARITIES FOR THE POTENTIAL DRUG SUBSTANCES OF 1,2,4-TRIAZOL-3-YLTHIOACETIC ACIDS AND THEIR SALTS SERIES BY THE METHOD OF HPLC/DAD-MS

B. O. Varynskyi, Ye. G. Knysh, V. V. Parchenko, O. I. Panasenko, A. G. Kaplaushenko

Key words: retention characteristics; 1,2,4-triazol-3-ylthioacetic acids; HPLC/DMD-MS

The derivatives of 1,2,4-triazole are potential drug substances with various biological activity. The control of stages for obtaining such compounds at the research and production phase is an important task of modern pharmaceutical science. HPLC/DAD-MS is the most universal and selective method, which allows to confirm the structure both of active substances and impurities and determine the content of analytes. The aim of the research is to study the dependence of the retention characteristic for the series of 1,2,4-triazol-3-ylthioacetic acids and their salts, which are the target products in the synthesis of the registered and potential drug substances by 8 synthetic schemes, on the content of acetonitrile in the mobile phase under the conditions of HPLC/DAD-MS determination. The dependence of the capacity factor k on the content of acetonitrile for 1,2,4-triazol-3-ylthioacetic acids and their salts has been determined. The possibilities of choice of conditions for determining these compounds both individually and in mixtures have been shown. It has been found that the reversed-phase retention mechanism for 1,2,4-triazol-3-ylthioacetic acids under study up to 65% content of acetonitrile in the eluent, and then the ion-exchange mechanism of interaction with silanol groups are observed. The exponential character of correlation between $\log D$ and capacity factors for the compounds tested has been determined for 15% content of acetonitrile in the mobile phase. It has been determined that correlation between $\log D$ and decimal logarithms of capacity factors for the compounds to be investigated has the linear character for 15% content of acetonitrile in the mobile phase.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ УДЕРЖИВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ РЯДА 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ИЛТІОАЦЕТАТНЫХ КИСЛОТ И ИХ СОЛЕЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ/ДМД-МС

Б.О.Варинский, Е.Г.Кныш, В.В.Парченко, О.И.Панасенко, А.Г.Каплаушенко

Ключевые слова: характеристики удерживания; 1,2,4-триазол-3-илтїоацетатные кислоты; ВЭЖХ/ДМД-МС

Производные 1,2,4-триазола являются потенциальными лекарственными веществами с различной биологической активностью. Контроль стадий получения таких соединений на исследовательском и производственном этапе является важной задачей современной фармацевтической науки. Наиболее универсальным и селективным методом, позволяющим подтвердить структуру как основных веществ, так и примесей и определять количественное содержание анализов, является ВЭЖХ/ДМД-МС. Целью исследования является изучение зависимости параметров удерживания ряда 1,2,4-триазол-3-илтїоацетатных кислот и их солей, являющихся конечными продуктами в синтезе зарегистрированных и потенциальных лекарственных веществ по 8 схемам синтеза, от содержания ацетонитрила в подвижной фазе в условиях ВЭЖХ/ДМД-МС-определения. Установлена зависимость коэффициента емкости k от со-

держання ацетонітрила для ряду 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот і їх солей. Показані можливості вибору умовий хроматографічного визначення цих сполук окремо, так і в сумісках. Установлено, що для досліджуваних 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот до 65% вмісту ацетонітрила в елюенті спостерігається обрешенно-фазовий механізм утримування, а згодом іонно-обмінний механізм взаємодії з силанольними групами. Установлено експоненціальний характер взаємодії між $\log D$ і коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісту ацетонітрила в складі рухомої фази. Установлено, що взаємодія між $\log D$ і десятичними логарифмами коефіцієнтів ємності досліджуваних сполук при 15% вмісту ацетонітрила в складі рухомої фази носить лінійний характер.

Похідні 1,2,4-триазолу є потенційними лікарськими речовинами з різноманітною біологічною активністю. Контроль стадій отримання таких сполук на дослідницькому і виробничому етапі є важливим завданням сучасної фармацевтичної науки. Найбільш універсальним і селективним методом, що дозволяє підтверджувати структуру як основних речовин, так і домішок та визначати кількісний вміст аналітів, є високоефективна рідинна хроматографія з діодно-матричним (ВЕРХ-ДМД) та мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС).

Необхідною вимогою розробки ВЕРХ-методик з ДМД- та МС-детекцією є оптимізація мас-спектрометричного детектування і хроматографічного розділення. Для того щоб підібрати оптимальні умови хроматографічного визначення напівпродуктів та сировини при синтезі солей 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот, з яких деякі вже зареєстровані і використовуються в сучасній ветеринарії (трифузол, авестім), а деякі (тіокс) знаходяться на стадії реєстрації і впровадження у виробництво, необхідно було дослідити залежність їх хроматографічного утримування від різних факторів.

Існує багато робіт, в яких описано дослідження утримування різних сполук від структури та властивостей сорбатів. Наприклад, це може бути коефіцієнт розподілу між октанолом та водою:

$$\log P_{\text{октанол/вода}} = \log \frac{[\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{неіоніза}}}{[\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{неіоніза}}} \quad (1)$$

Лінійну залежність між логарифмами коефіцієнта розподілу та коефіцієнта ємності можна знайти в монографії [1]:

$$\lg k = a + \lg P_{ij} \quad (2)$$

де P_{ij} – коефіцієнт розподілу речовин між фазами i та j .

Ряд публікацій присвячений дослідженню взаємозв'язку між характеристиками утримування та коефіцієнтами розподілу, які найчастіше використовуються для визначення характеристик ліпофільності за результатами утримування в обернено-фазовій ВЕРХ (ОФ ВЕРХ) [2-9]. Авторами [10] наведені дані щодо визначення ліпофільності нових тіосемікарбазидів та похідних 1,2,4-триазол-3-тіонів на підставі результатів ОФ ВЕРХ та теоретичних розрахунків.

F. Lombardo із співавторами [11] досліджували залежності утримування та $\log D$ для іоногенних сполук:

$$\log D_{\text{октанол/вода}} = \log \frac{[\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{іоніза}} + [\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{неіоніза}}}{[\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{іоніза}} + [\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{неіоніза}}} \quad (3)$$

Визначені залежності в більшості робіт пропонується використовувати для експериментального визначення $\log P$ та $\log D$, які є важливими показниками при вивченні ADME (адсорбції, дистрибуції, метаболізму та екскреції).

Утримування сполук також залежить від властивостей рухомої фази, зокрема від концентрації органічного модифікатора. Так, існує лінійна залежність між логарифмом коефіцієнта ємності та вмістом органічного розчинника [12]:

$$\lg k = a - b \cdot \%B, \quad (4)$$

де: $\%B$ – процентний вміст органічного модифікатора; a та b – константи. Існує декілька робіт, де наведені результати досліджень залежності утримування від вмісту ацетонітрилу [13-15].

З метою дослідження характеру взаємозв'язку часу утримування та складу рухомої фази для ВЕРХ-ДМД та ВЕРХ-МС визначення ряду 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот (сполуки **1-8**) та їх солей (сполуки **9-15**) нами було експериментально вивчено залежність коефіцієнта ємності k для діодно-матричного та мас-спектрометричного детектора від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі, який є найбільш суттєвим і специфічним для різних сполук фактором утримування.

Мас-спектрометричне детектування проводили в режимі іонізації в електроспреї, оптимальні умови якої були встановлені нами експериментально [16] (таблиця).

Раніше авторами [17-19] були описані умови ВЕРХ-визначення похідних ряду 1,2,4-тіотриазолів. Як органічний модифікатор застосовували ацетонітрил. Авторами запропонували проводити визначення в кислому середовищі ($\text{pH} \leq 3,0$); при цьому для його створення обрали фосфатну кислоту.

Ми запропонували використовувати формиатну кислоту як більш летку і більш зручну для використання при мас-спектрометричному детектуванні.

1,2,4-Триазол-3-ілітіоацетатні кислоти та відповідні солі елюються практично однаково, тому що в кислому середовищі елюенту солі переходять у кис-

Оптимальні умови іонізації досліджуваних сполук в електроспреї
(Т – температура газу-осушувача, U – напруга на фрагментаторі, Р – тиск на небулайзері)

Кислоти	SIM, m/z	Оптимальні умови			Солі	SIM, m/z	Оптимальні умови		
		T	U	P			T	U	P
1	343	300	142	48	9	343	300	142	53
2	302	100	138	10	10	302	247	149	46
3	237	300	144	51	11	237	300	144	50
4	335	300	139	51	12	335	300	141	52
5	273	224	135	48	14	273	228	138	57
6	287	234	137	49	13	287	300	144	10
7	259	300	140	53					
8	266	201	0	56	15	266	300	145	60

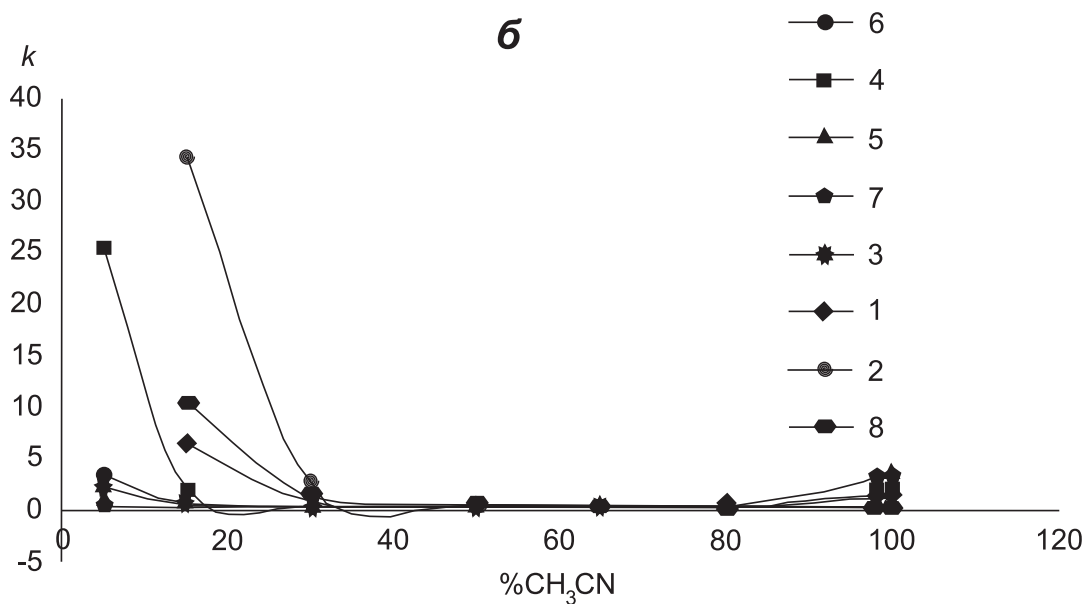
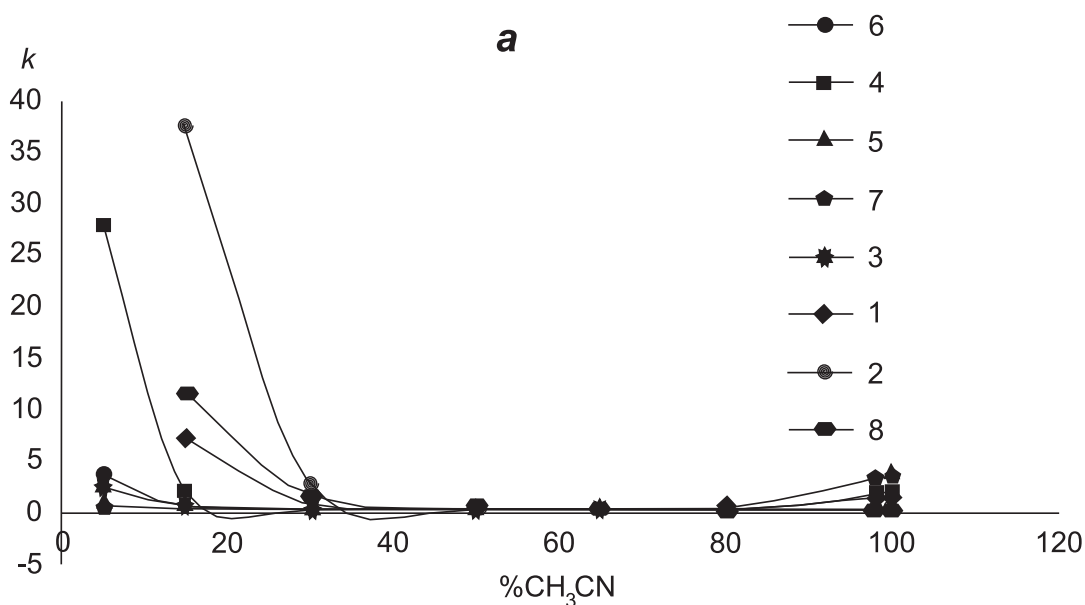


Рис. 1. Залежність коефіцієнта ємності k 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот **1-8** від концентрації ацетонітрилу в складі рухомої фази: **а** – діодно-матричний детектор; **б** – мас-спектрометричний детектор.

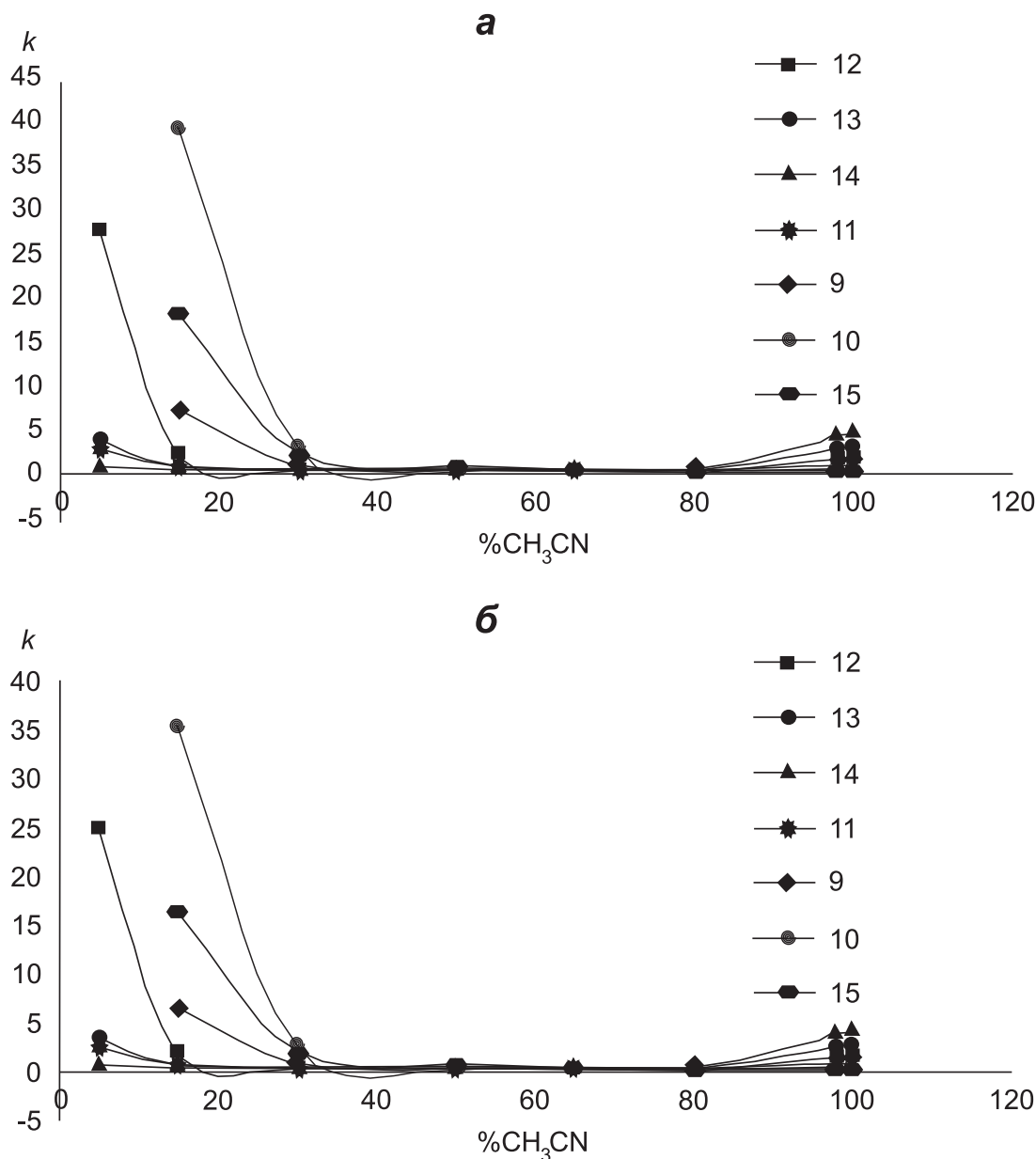


Рис. 2. Залежність коефіцієнта ємності k солей 1,2,4-триазол-3-ілтїоацетатних кислот **9-15** від концентрації ацетонїтрилу в складї рухомої фази: **а** – діодно-матричний детектор; **б** – мас-спектрометричний детектор.

лотну форму (рис. 1, 2). Можна зазначити, що для досліджуваних 1,2,4-триазол-3-ілтїоацетатних кислот **1-8** спочатку спостерігається зменшення коефіцієнта ємності зі зростанням вмісту ацетонїтрилу (обернено-фазовий механїзм утримування). В обернено-фазовій хроматографії утримування є меншим для менш полярних рухомих фаз, зі зростанням концентрації ацетонїтрилу полярність рухомої фази знижується, тому утримування також зменшується [1, 12, 20].

На рис. 3 показано залежність логарифму коефіцієнта ємності від логарифму вмісту ацетонїтрилу для мас-спектрометричного детектора для досліджуваних кислот та солей відповідно. Для більшості аналітів спостерігається така закономірність – практично лінійне зниження логарифму коефіцієнта ємності із зростанням логарифму вмісту

ацетонїтрилу при його зміні від 5 до 65%. Для кислоти **8** та відповідної солі **15** спостерігається практично лінійне зниження протягом всього діапазону концентрацій ацетонїтрилу.

На рис. 4 наведені графіки залежності логарифму коефіцієнта ємності від вмісту ацетонїтрилу для мас-спектрометричного детектора.

При концентрації ацетонїтрилу більше 65% фіксується зростання коефіцієнта ємності зі збільшенням вмісту ацетонїтрилу (іонно-обмінний механїзм взаємодії з силанольними групами). Повідомляється [1], що подібна залежність спостерігається для широкого кола пропонованих лікарських речовин основного характеру. В роботі [1] також стверджується, що підвищення утримування при більших концентраціях органічного модифікатора обумовлене полярною взаємодією речо-

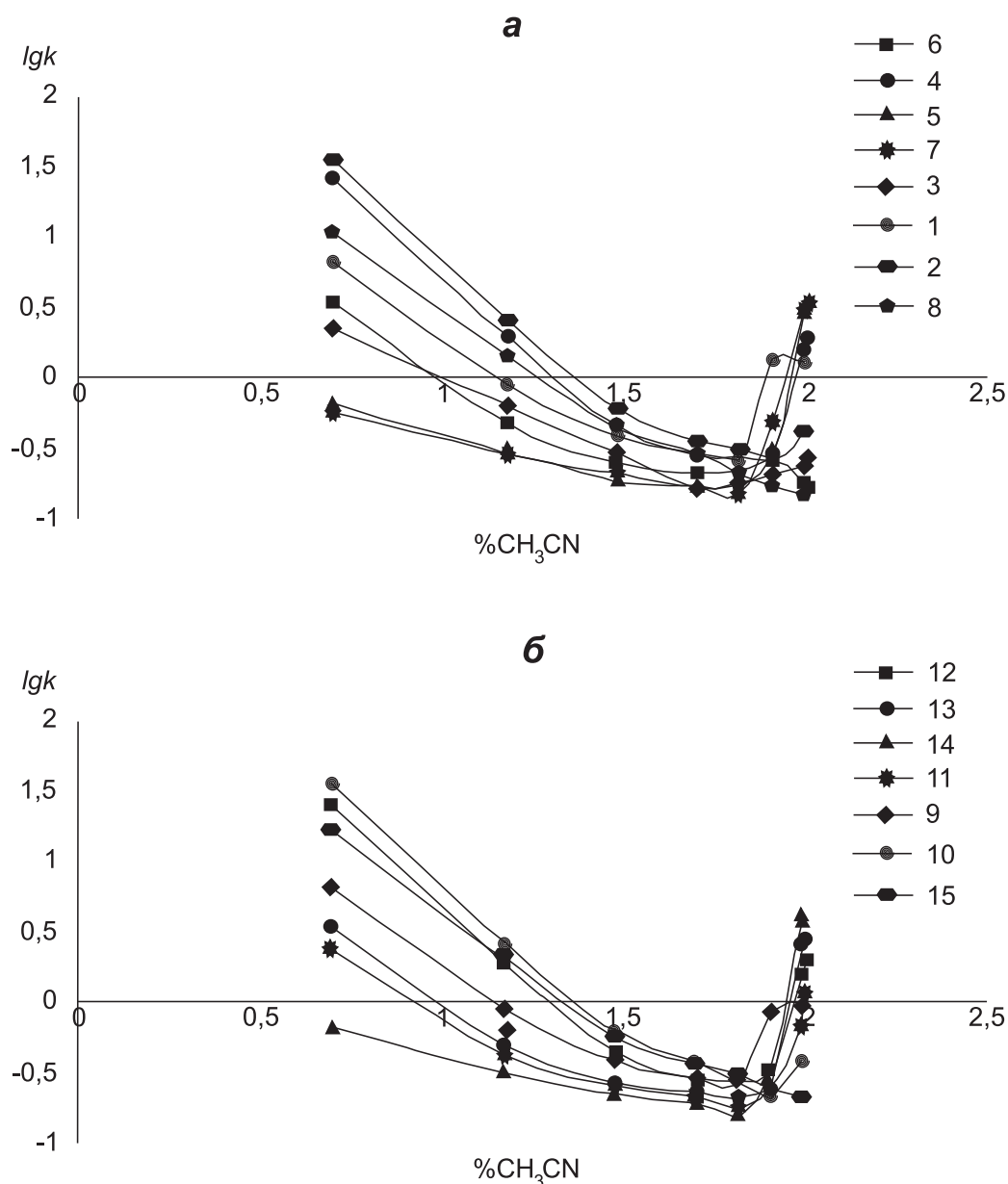


Рис. 3. Залежність логарифму коефіцієнта ємності lgk від логарифму концентрації ацетонітрилу в складі рухомої фази: **а** – 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатні кислоти **1-8**; **б** – солі 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот **9-15**.

вин із стаціонарною фазою; найбільш ймовірним механізмом такої взаємодії є іонний обмін.

На підставі отриманих залежностей можна обрати умови хроматографічного дослідження з необхідним часом аналізу окремих сполук, а також підібрати умови визначення таких сполук у сумішах, визначивши максимальну різницю в коефіцієнтах утримування графічним способом для розробки методик їх кількісного визначення як в індивідуальних препаратах, так і в комбінованих засобах.

Раніше нами були досліджені і описані закономірності утримування гідразидів та карботіоамідів 1,2,4-триазол-3-тіоацетатних кислот та відповідних 1,2,4-триазол-3-тіонів [21], що є вихідними речовинами для синтезу досліджуваних кислот та їх солей, і тому можуть бути присутніми як домішки в потенційних лікарських субстанціях.

Інформація щодо характеру залежностей параметрів хроматографічного утримування від вмісту ацетонітрилу в складі рухомої фази як для діючих речовин, так і для можливих домішок може стати теоретичним підґрунтям для створення комплексних методик їх визначення у сумішах.

Для того щоб охарактеризувати ліпофільні властивості та врахувати іонізацію сполук при різних рН, було розраховано значення $\log D$. Даний показник з більшою, ніж для $\log P$, достовірністю може бути використаний для характеристики утримування сполук, оскільки він залежить від рН середовища і враховує їх іоногенний характер. Дослідження утримування проводили з використанням кислотного буфера (форміатна кислота) з метою зменшення взаємодії нітрогеновмісних

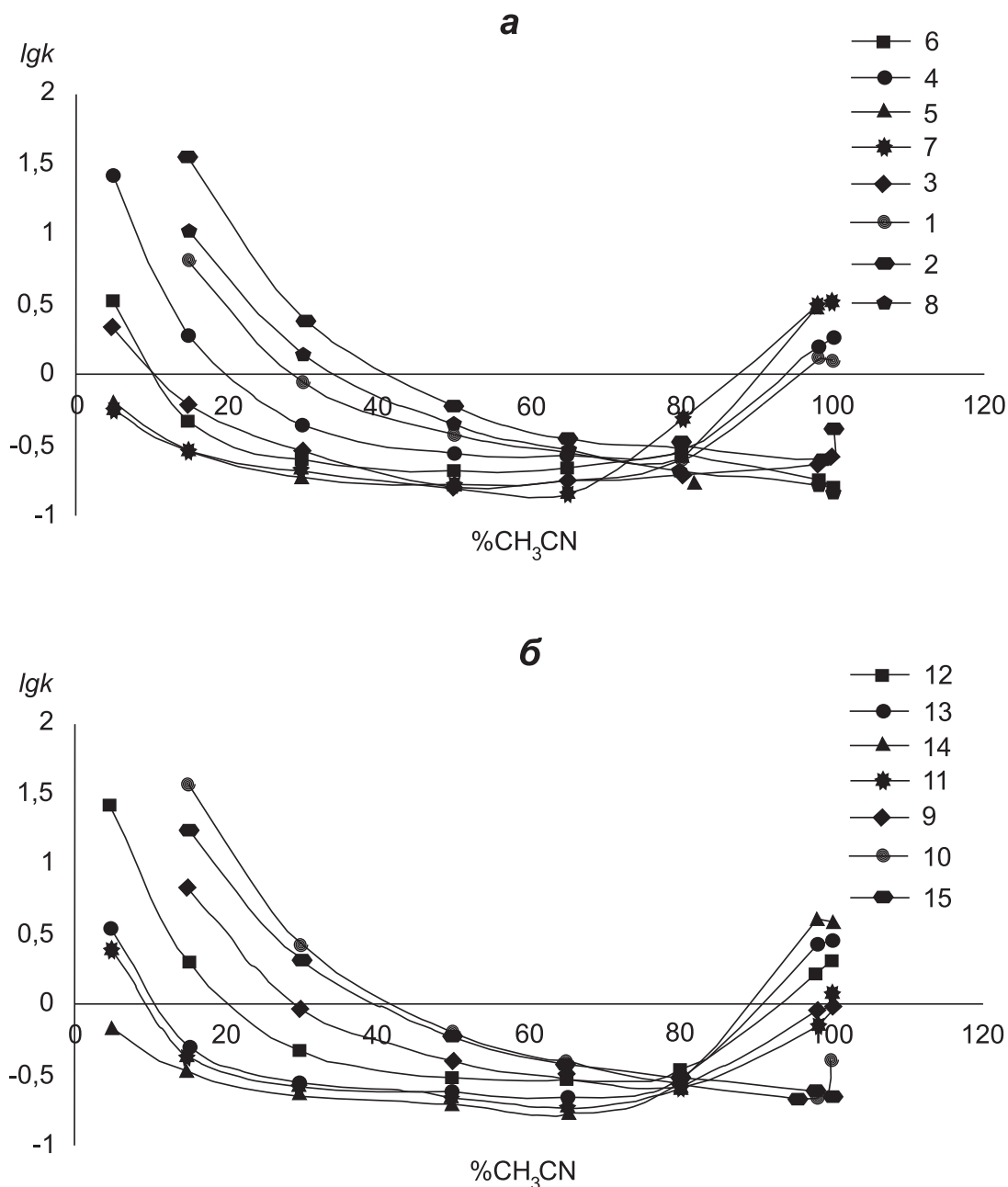


Рис. 4. Залежність логарифму коефіцієнта ємності $\lg k$ від концентрації ацетонітрилу в складі рухомої фази: **а** – 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатні кислоти **1-8**; **б** – солі 1,2,4-триазол-3-ілітіоацетатних кислот **9-15**.

сполук з силанольними групами та збільшення утримування за обернено-фазовим механізмом за рахунок протонування карбоксильних груп; рН буферного розчину (0,1% формиатної кислоти) становить (якщо вважати, що елюент складається тільки з води) наступну величину:

$$pH = 1/2 pK_a - 1/2 \lg C_a = 1/2 \cdot 3,75 - 1/2 \cdot \lg 0,0265 = 2,66. \quad (5)$$

Отримане експериментальне значення рН складає 2,76.

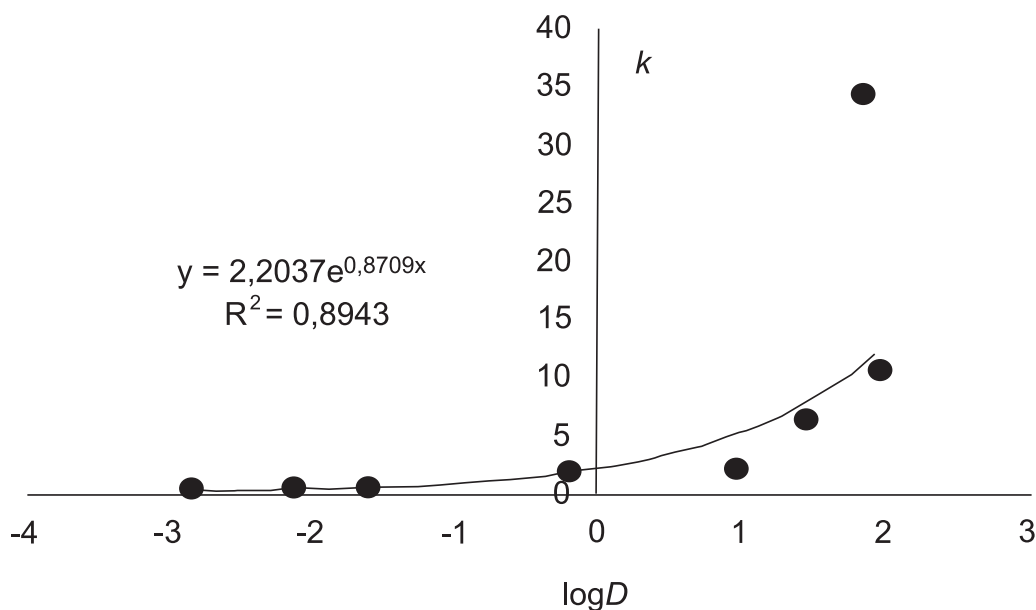
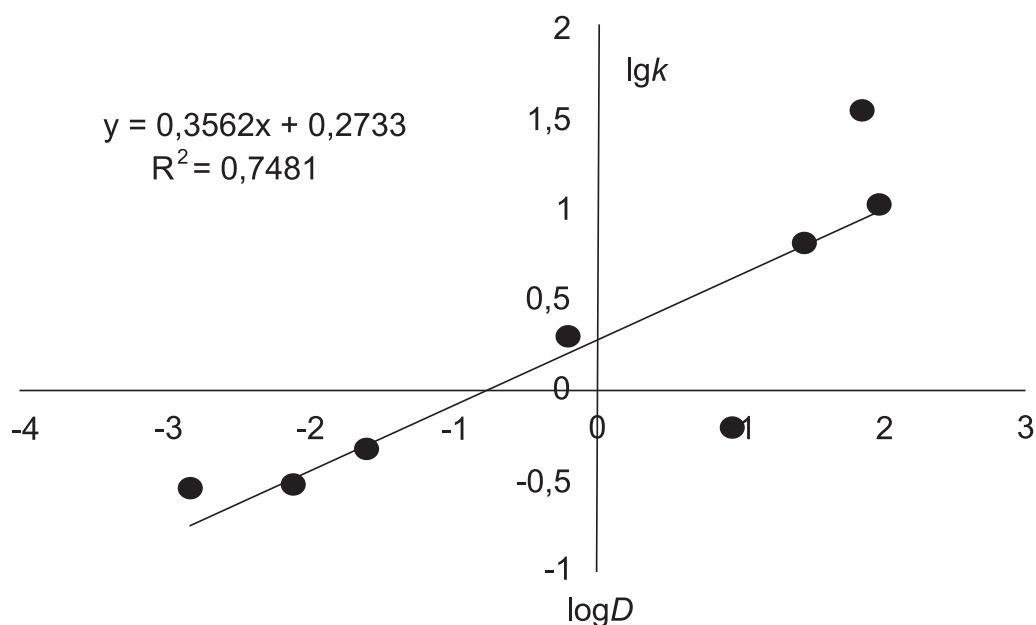
Нами було розраховано $\log D$ для досліджуваних сполук; коефіцієнти ємності при цьому синхронно (експоненціальна залежність) змінюються з розра-

хованими значеннями $\log D$ (рис. 5). Взаємозв'язок $\lg k$ та $\log D$ носить лінійний характер (рис. 6).

Експериментальна частина

В роботі досліджено 2 групи субстанцій нових сполук, синтезованих на кафедрах фізикоїдної хімії (зав. каф. – д. фарм. н., доц. Каплаушенко А.Г.), токсикологічної та неорганічної хімії (зав. каф. – д. фарм. н., проф. Панасенко О.І.) Запорізького державного медичного університету, структуру яких було попередньо доведено методами ^1H ЯМР-спектроскопії:

група I: 2-((R-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетатні кислоти, де R:
1 – 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл);

Рис. 5. Залежність коефіцієнта ємності k 1,2,4-триазол-3-ілтіоацетатних кислот **1-8** (при 15% CH_3CN) від $\log D$.Рис. 6. Залежність логарифму коефіцієнта ємності $\lg k$ 1,2,4-триазол-3-ілтіоацетатних кислот **1-8** (при 15% CH_3CN) від $\log D$.

- 2** – 4-феніл-5-(фуран-2-іл);
3 – 5-(піридин-4-іл);
4 – 4-феніл-5-(морфолінометил);
5 – 4-метил-5-(морфолінометил);
6 – 4-етил-5-(морфолінометил);
7 – 5-(морфолінометил);
8 – 5-(2-метоксифеніл);
група II: солі кислот групи I:
9 – морфолін-4-ій кислоти **1**;
10 – піперидин-1-ій кислоти **2**;
11 – морфолін-4-ій кислоти **3**;
12 – морфолін-4-ій кислоти **4**;
13 – морфолін-4-ій кислоти **6**;
14 – піперидин-1-ій кислоти **5**;

15 – цинкова сіль кислоти **8**.

Для кислоти **7** солі не досліджували у зв'язку з їх високою гігроскопічністю.

Для досліджуваних сполук готували розчини з концентрацією 1 мг/мл в суміші ацетонітрилу з водою (1:1); для сполук **3** та **15** як розчинник використовували диметилсульфоксид.

Дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії проводили за таких умов:

- прилад – Agilent 1260 Infinity HPLC System (дегазатор, бінарний насос, автосамплер);
- програмне забезпечення – OpenLAB CDS;
- колонка – $\varnothing 4,6 \times 30$ мм, обернена фаза Zorbax SB C18, 1,8 мкм;

- температура колонки – 40°C;
- елюент А – H₂O – 0,1% HCOOH;
- елюент В – CH₃CN – 0,1% HCOOH;
- потік – 400 мкл/хв;
- ізократичні режими – 5, 15, 30, 50, 65, 80, 98 та 100% В;
- детектор: 1) діодно-матричний ($\lambda = 254$ нм); 2) одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120: джерело іонів – API-ES; полярність – позитивна; режим SIM; газ-осушувач – азот (швидкість – 10 л/хв); сканування в діапазоні m/z відповідно до молекулярної маси сполук; температуру газу-осушувача, напругу на фрагментаторі та тиск на небулайзері для кожної з досліджуваних сполук наведено в таблиці.

В роботі використано ацетонітрил кваліфікації «для ВЕРХ» та формиатна кислота 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Високоочищену воду (18 М Ω за температури 25°C) було виготовлено з використанням системи очищення води Direct Q 3UV (Millipore, Molsheim, France).

Література

1. Shatts V. D., Sahartova O. V. *Vysokoeffektivnaya zhidkostnaya hromatografiya: Osnovy teorii. Metodologiya. Primenenie v lekarstvennoy himii – High-performance liquid chromatography: Theory foundations. Methodology. Application in medicinal chemistry*, Riga: Zinatne, 1988, 390 p.
2. Podunavac-Kuzmanović S. O., Jevrić L. R., Tepić A. N., Šumić Z. *Hem. Ind.*, 2013, No.67(6), pp.933-940.
3. Nasal A., Kalisz R. *Curr. Comp.-Aided Drug Design*, 2006, No.2, pp.327-340.
4. Henchoz Y., Guillaume D., Martel S. et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, No.394 (7), pp.1919-1930.
5. Guillot A., Henchoz Y., Moccand C. et al. *Chem. Biodiversity*, 2009, No.6(11), pp.1828-1836.
6. Perisic-Janjic N., Kalisz R., Wiczling P. *Mol. Pharm.*, 2011, No.2, pp.555-563.
7. Wiczling P., Struck-Lewicka W., Kubik Ł. et al. *Anal. Chem.*, 2006, No.78(1), pp.239-249.
8. Zheng B., West L. M. J. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2009, No.33(1), pp.118-132.
9. Lombardo F., Shalaeva M. Y., Tupper K. A. et al. *J. Med. Chem.*, 2000, No.43, pp.2922-2928.
10. Hawrył A., Kuśmierz E., Hawrył M., et al. *J. Liq. Chrom. R. T.*, 2015, No.38, pp.430-437.
11. Lombardo F., Shalaeva Marina Y., Tupper Karl A. et al. *J. Med. Chem.*, 2001, No.44, pp.2490-2497.
12. Snyder L. R., Dolan J. W. *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007, 461 p.
13. Xia L., Yong L., Juan Ch., Yan-Ping Sh. *J. Chrom. Sci.*, 2010, No.48, pp.76-80.
14. Baeza-Baeza J. J., Ortiz-Bolsico C., Torres-Lapasió J. R., García-Álvarez-Coque M. C. *J. Chrom. A.*, 2013, No.1284, pp.28-35.
15. Hong Y. L., Ding Y., Wang L. et al. *J. Liq. Chrom. R. T.*, 1999, No.22(6), pp.897-907.
16. Varynskyi B. O. *Odeskyi medychnyi zhurnal – Odessa medical journal*, 2015, No.4, pp.17-21.
17. Georgievskiy G. V., Kulikov A. Yu. *Farmakom*, 2009, No.2, pp.67-98.
18. Georgievskiy G. V. *Analiticheskaia zabezpechennia syntezu, standartyzatsii ta orhanizatsii vyrobnytstva pokhidnykh 1,2,4-tryazolov ta yikh likarskykh form – Analytical software for the synthesis, standardization and organization of manufacturing of derivatives of 1,2,4-triazole and their drug dosage forms*, Kharkiv, 2013, 44 p.
19. *Analiticheskaia khimiia v sozdani, standartyzatsii i kontroli kachestva lekarstvennykh sredstv – Analytical Chemistry in the Development, Standardization and Quality Control of Medications* / Ed. by V. P. Georgievskiy, Kharkiv: HTMT, 2011, 1450 p.
20. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. *Practical HPLC Method Development*, Wiley-Interscience, 1997, 542 p.
21. Varynskyi B. O. *Problemy viiskovoï okhorony zdorovia: Zbirnyk naukovykh prats Ukrainsoï viiskovo-medychnoi akademii – Problems of military health care: Collection of scientific works of the Ukrainian military medical academy*, 2015, No.43, pp.320-330.

Надійшла до редакції 15.09.2015 р.

Висновки

Встановлено залежність коефіцієнта ємності k від вмісту ацетонітрилу для ряду 1,2,4-триазол-3-ілтіоацетатних кислот та їх солей, що є кінцевими продуктами в синтезі ряду потенційних лікарських речовин. Показано можливості вибору умов хроматографічного визначення цих сполук як окремо, так і в сумішах.

Встановлено, що для досліджуваних 1,2,4-триазол-3-ілтіоацетатних кислот до 65% вмісту ацетонітрилу в елюенті спостерігається обернено-фазовий механізм утримування, а потім іонообмінний механізм взаємодії з силанольними групами.

Показано експоненційний характер взаємозв'язку між $\log D$ та коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісті ацетонітрилу в складі рухомої фази.

Встановлено, що взаємозв'язок між $\log D$ та десятиковими логарифмами коефіцієнтів ємності досліджуваних сполук при 15% вмісті ацетонітрилу в складі рухомої фази носить лінійний характер.

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ НАЗВАНИЙ ЖУРНАЛОВ И СПРАВОЧНИКОВ

Биоорганическая химия	Биоорг. хим.
Българска Академия на науките. Известия на отделението за химическите науки	Изв. Бълг. АН
Бюллетень изобретений	Б. И.
Бюлетень винаходів	Б. В.
Высокомолекулярные соединения	Высокомол. соед.
Гласник хемиского друштва	Гласн. хем. друштва
Доклады Академии наук СССР	Докл. АН СССР (с 1992 г. – Докл. РАН)
Журнал аналитической химии	ЖАХ
Журнал неорганической химии	ЖНХ
Журнал общей химии	ЖОХ
Журнал органической химии	ЖОрХ
Журнал прикладной спектроскопии	Ж. прикл. спектр.
Журнал прикладной химии	ЖПХ
Журнал структурной химии	ЖСХ
Журнал физической химии	ЖФХ
Известия Академии наук СССР. Серия химическая	Изв. АН СССР. Сер. хим. (с 1992 – Изв. РАН. Сер. хим.)
Известия высших учебных заведений	Изв. вузов.
Химия и химическая технология	Хим. и хим. технол.
Коллоидный журнал	Колл. журн.
Металлоорганическая химия	Металлоорг. хим.
Оптика и спектроскопия	Опт. и спектр.
Реакционная способность органических соединений	Реакц. способн. орг. соед.
Реферативный журнал «Химия»	РЖХим.
Российский химический журнал	Рос. хим. журн.
Синтезы органических препаратов	Синт. орг. преп.
Теоретическая и экспериментальная химия	ТЭХ
Украинский химический журнал	Укр. хим. журн.
Успехи химии	Усп. хим.
Фармакология и токсикология	Фармакол. и токсикол.
Химия гетероциклических соединений	ХГС
Химия природных соединений	ХПС
Accounts of Chemical Research	Acc. Chem. Res.
Acta Chemica Scandinavica	Acta Chem. Scand.
Acta chimica academiae scientiarum Hungaricae	Acta chim. acad. sci. Hung.
Analytical Chemistry	Anal. Chem.
Angewandte Chemie	Angew. Chem.
Angewandte Chemie, International Edition	Angew. Chem., Int. Ed.
Annalen der Chemie (Justus Liebig's Annalen der Chemie)	Lieb. Ann.
Annales de chimie (Paris)	Ann. chim.
Arkiv for Kemi	Ark. Kemi
Australian Journal of Chemistry	Austral. J. Chem.
Beilsteins Handbuch der organischen Chemie	Beilst.
Bioorganic Medical Chemistry	Bioorg. Med. Chem.
Bioorganic Medical Chemistry Letters	Bioorg. Med. Chem. Lett.
Bulletin of the Chemical Society of Japan	Bull. Chem. Soc. Jpn
Bulletin de la Societe chimique de France	Bull. Soc. Chim. Fr.
Canadian Journal of Chemistry	Canad. J. Chem.
Chemical Abstracts	C.A.

Chemical Communications	Chem. Commun.
Chemical European Journal	Chem. Eur. J.
Chemical Reviews	Chem. Rev.
Chemische Zeitung	Chem. Ztg.
Chemische Berichte	Chem. Ber.
Chemistry and Industry	Chem. Ind.
Chimie analytique	Chim. analyt.
Collection of Czechoslovak Chemical Communications	Coll. Czech. Chem.Commun.
Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences	C. r.
Gazzetta chimica italiana	Gazz. chim. ital.
Heterocycles	Heterocycles
Helvetica chimica acta	Helv. chim. acta
Industrial and Engineering Chemistry	Ind. Eng. Chem.
Journal of the American Chemical Society	J. Am. Chem. Soc.
Journal of Chemical Physics	J. Chem. Phys.
Journal of the Chemical Society (London)	J. Chem. Soc.
Journal de chimie physique et de physicochimie biologique	J. chim. phys.
Journal of Heterocyclic Chemistry	J. Heterocycl. Chem.
Journal of the Indian Chemical Society	J. Indian Chem. Soc.
Journal of Medical Chemistry	J. Med. Chem.
Journal of Organic Chemistry	J. Org. Chem.
Journal of Organometallic Chemistry	J. Organometal. Chem.
Journal of Physical Chemistry	J. Phys. Chem.
Journal fuer praktische Chemie	J. pr. Chem.
Monatshefte fuer Chemie	Monatsh. Chem.
Nature (London)	Nature
Nippon Kagaku Zasshi (Journal of the Chemical Society of Japan. Pure Chemistry Section)	Nippon Kagaku Zasshi
Organic Preparations and Procedures International	Org. Prep. Proced.
Pure and Applied Chemistry	Pure Appl. Chem.
Quarterly Reviews	Quart. Rev.
Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas	Rec. trav. chim.
Revista de chimie (Bucharest)	Rev. chim.
Roczniki Chemii	Roczn. Chem.
Spectrochimica acta	Spectr. acta
Synlett	Synlett
Synthesis	Synthesis
Tetrahedron	Tetrahedron
Tetrahedron Letters	Tetrahedron Lett.
Transactions of the Faraday Society	Trans. Faraday Soc.

Условные сокращения названий, не вошедших в список журналов и периодических изданий, приводятся в соответствии с сокращениями, принятыми в С.А. (для журналов, использующих кириллицу, – в РЖХим).

ЗМІСТ / CONTENTS / СОДЕРЖАНИЕ

THE SYNTHESIS OF 1,5-DIARYL-4-ARYLTHIOPYRROLIDIN-2-ONES BY ARYLSULFENYLATION OF STYRYL ACETIC ACID N-ARYLAMIDES / N.M.Tsyzoryk, I.Yu.Danyliuk, A.I.Vaskevych, R.I.Vaskevych, M.V.Vovk	3
Синтез 1,5-діарил-4-арилтіопіролідин-2-онів реакцією арилсульфенілювання N-ариламідів стирилоцтової кислоти / Н.М.Цизорик, І.Ю.Данилюк, А.І.Васькевич, Р.І.Васькевич, М.В.Вовк	
Синтез 1,5-диарил-4-арилтиопирролидин-2-онов реакцией арилсульфенилирования N-ариламидов стирилуксусной кислоты / Н.М.Цизорик, И.Ю.Данилюк, А.И.Васькевич, Р.И.Васькевич, М.В.Вовк	
METHYLATION OF POSITION 8 IN THE PYRIDINE MOIETY OF THE N-(BENZYL)-2-HYDROXY-4-OXO-4H-PYRIDO[1,2-a]PYRIMIDINE-3-CARBOXAMIDE MOLECULE AS AN ATTEMPT TO ENHANCE THEIR ANALGESIC PROPERTIES / I.V.Ukrainets, O.V.Gorokhova, L.V.Sydorenko, S.G.Taran	6
Метилування положення 8 піридинової частини молекули N-(бензил)-2-гідрокси-4-оксо-4H-піридо[1,2-a]піримідин-3-карбоксамідів як спроба посилення їх анальгетичних властивостей / І.В.Українець, О.В.Горохова, Л.В.Сидоренко, С.Г.Таран	
Метилирование положения 8 пиридиновой части молекулы N-(бензил)-2-гидрокси-4-оксо-4H-пиридо[1,2-a]пириимидин-3-карбоксамидов как попытка усиления их анальгетических свойств / И.В.Украинец, О.В.Горохова, Л.В.Сидоренко, С.Г.Таран	
A CONVENIENT WAY OF 3-FLUORO-1,8-NAPHTHALIMIDE SYNTHESIS / N.F.Fed'ko, V.F.Anikin	12
Зручний шлях синтезу іміду 3-фторо-1,8-нафталіндикарбонової кислоти / Н.Ф.Федько, В.Ф.Анікін	
Удобный путь синтеза имида 3-фторо-1,8-нафталиндикарбоновой кислоты / Н.Ф.Федько, В.Ф.Аникин	
TESTING OF A NEW DOCKING SCORING FUNCTION ON THE EXAMPLE OF INHIBITORS OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1B / V.Yu.Tanchuk, V.O.Tanin.....	16
Тестування нової оціночної функції для молекулярного докінгу на прикладі інгібіторів протеїнотирозинфосфатази 1B / В.Ю.Танчук, В.О.Танін	
Тестирование новой оценочной функции для молекулярного докинга на примере ингибиторов протеинтирозинфосфатазы 1B / В.Ю.Танчук, В.А.Танин	
SYNTHESIS AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 3-(2-METHYL-4-OXO-1,4-DIHYDROQUINOLINE-3-YL) PROPANOIC ACIDS/ V.O.Zubkov, T.P.Osolodchenko, N.I.Ruschak, O.L.Kamenetska, O.V.Kiz	20
Синтез та антимікробна активність 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-іл)пропанових кислот / В.О.Зубков, Т.П.Осолодченко, Н.І.Рушак, О.Л.Каменецька, О.В.Кіз	
Синтез и антимикробная активность 3-(2-метил-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-ил)пропановых кислот / В.А.Зубков, Т.П.Осолодченко, Н.И.Рушак, О.Л.Каменецкая, О.В.Киз	
THE SYNTHESIS AND ANTICANCER PROPERTIES OF 2-(4-AMINO-5-METHYL-4H-[1,2,4]TRIAZOL-3-YLSULFANYL)-N-(5-R-BENZYLTHIAZOL-2-YL)-ACETAMIDES / Yu.V.Ostapiuk, V.S.Matyichuk, M.D.Obushak.....	27
Синтез і протипухлинна активність 2-(4-аміно-5-метил-4H-[1,2,4]триазол-3-ілсульфаніл)-N-(5-R-бензилтіазол-2-іл)-ацетамідів / Ю.В.Остап'юк, В.С.Матійчук, М.Д.Обушак	
Синтез и противоопухолевая активность 2-(4-амино-5-метил-4H-[1,2,4]триазол-3-ил-сульфанил)-N-(5-R-бензилтиазол-2-ил)-ацетамидов / Ю.В.Остапюк, В.С.Матийчук, М.Д.Обушак	
THE SYNTHESIS, REACTIVITY AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SUBSTITUTED THIENO[2,3-d]PYRIMIDINE-4(3H)-THIO(SELENO)NES / D.O.Kolomieitsev, V.I.Markov, V.O.Astakhina, S.I.Kovalenko, S.A.Varenichenko.....	32
Синтез, реакційна здатність та антимікробна активність заміщених тієно[2,3-d]піримідин-4(3H)-тіо(селено)нів / Д.О.Коломійцев, В.І.Марков, В.О.Астахіна, С.І.Коваленко, С.А.Варениченко, О.В.Харченко	
Синтез, реакционная способность и антимикробная активность замещенных тиено[2,3-d]пиримидин-4(3H)-тио(селено)нов / Д.О.Коломейцев, В.И.Марков, В.О.Астахина, С.И.Коваленко, С.А.Варениченко, А.В.Харченко	
THE STUDY OF REGULARITIES OF THE STRUCTURE – ANALGESIC ACTIVITY RELATIONSHIP IN A SERIES OF 4-HYDROXY-N-(PYRIDIN-2-YL)-2,2-DIOXO-1H-2λ ⁶ ,1-BENZOTHAZINE-3-CARBOXAMIDES / I.V.Ukrainets, L.O.Petrushova, O.V.Gorokhova, O.O.Davydenko	39
Вивчення закономірностей зв'язку структура – анальгетична активність у серії 4-гідрокси-N-(піридин-2-іл)-2,2-діоксо-1H-2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксамідів / І.В.Українець, Л.О.Петрушова, О.В.Горохова, О.О.Давиденко	
Изучение закономерностей связи структура – анальгетическая активность в серии 4-гидрокси-N-(пиридин-2-ил)-2,2-диоксо-1H-2λ ⁶ ,1-бензотиазин-3-карбоксамидов / И.В.Украинец, Л.А.Петрушова, О.В.Горохова, А.А.Давиденко	

THE COMPLEXING ABILITY OF N-SUBSTITUTED THIOUREA DERIVATIVES AS CHELATING LIGANDS IN THE REACTION WITH PdCl ₂ / Yu.L.Zborovskii, V.V.Orsyk, D.O.Melnychenko, S.I.Orsyk, H.H.Repich, L.V.Garmanchuk, L.I.Palchykovska, V.I.Pekhnyo, M.V.Vovk	44
Комплексоутворювальна здатність N-заміщених похідних тиосечовини як хелатуючих лігандів у реакції з Pd(II) / Ю.Л.Зборовський, В.В.Орисик, Д.О.Мельниченко, С.І.Орисик, Г.Г.Репіч, Л.В.Гарманчук, Л.І.Пальчиківська, В.І.Пехньо, М.В.Вовк	
Комплексообразующая способность N-замещенных производных тиомочевины как хелатирующих лигандов в реакции с Pd(II) / Ю.Л.Зборовский, В.В.Орысык, Д.А.Мельниченко, С.И.Орысык, Г.Г.Репич, Л.В.Гарманчук, Л.И.Пальчиковская, В.И.Пехньо, М.В.Вовк	
5,6-DIHYDRO-[1,2,4]TRIAZOLO[1,5-c]QUINAZOLINES. MESSAGE 1. FEATURES OF INTERACTIONS BETWEEN [2-(3-ARYL-1H-1,2,4-TRIAZOLE-5-YL)PHENYL]AMINES, ALIPHATIC AND AROMATIC ALDEHYDES / S.V.Kholodnyak, K.P.Schabelnyk, O.Yu.Voskoboynik, G.G.Berest, S.I.Kovalenko	50
5,6-Дигідро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназоліни. Повідомлення 1. Особливості поведінки [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-іл)феніл]амінів в реакціях з альдегідами алифатичного та ароматичного ряду / С.В.Холодняк, К.П.Шабельник, О.Ю.Воскобойнік, Г.Г.Берест, С.І.Коваленко	
5,6-Дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хиназолины. Сообщение 1. Особенности поведения [2-(3-арил-1H-1,2,4-триазол-5-ил)фенил]аминов в реакциях с альдегидами алифатического и ароматического ряда / С.В.Холодняк, К.П.Шабельник, А.Ю.Воскобойник, Г.Г.Берест, С.И.Коваленко	
СИНТЕЗ ТА ОЦІНКА БАКТЕРИЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ 4-(4-ХЛОРО-1H-ІМІДАЗОЛ-5-ІЛ)-2-ОКСО-1,2-ДИГІДРОПІРИДИН-3-КАРБОНІТРИЛІВ / О.Я.Мельник, В.О.Чорноус, Н.Д.Яковичук, Н.В.Мельниченко, М.В.Вовк	57
The synthesis and evaluation of the bactericidal activity of 4-(4-chloro-1H-imidazol-5-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-carbonitriles / О.Я.Мел'ник, В.О.Чорноус, Н.Д.Яковичук, Н.В.Мел'ніченко, М.В.Вовк	
Синтез и оценка бактерицидной активности 4-(4-хлор-1H-имидазол-5-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрилов / О.Я.Мельник, В.А.Чорноус, Н.Д.Яковичук, Н.В.Мельниченко, М.В.Вовк	
DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES IN RIBOXIN TABLETS / M.V.Rosada, N.Yu.Bevz, V.A.Georgiyants.....	62
Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок у таблетках рибоксин / М.В.Росада, Н.Ю.Бевз, В.А.Георгіянтц	
Разработка и валидация методики определения сопутствующих примесей в таблетках рибоксин / Н.В.Росада, Н.Ю.Бевз, В.А.Георгиянтц	
Вивчення закономірностей утримування потенційних лікарських субстанцій ряду 1,2,4-триазол-3-ілтіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ/ДМД-МС / Б.О.Варинський, Є.Г.Книш, В.В.Парченко, О.І.Панасенко, А.Г.Каплаушенко	
The study of retention regularities for the potential drug substances of 1,2,4-triazol-3-ylthioacetic acids and their salts series by the method of HPLC/DAD-MS / В.О.Варынський, Ye.G.Knysh, V.V.Parchenko, O.I.Panasenko, A.G.Kaplaushenko	
Изучение закономерностей удерживания потенциальных лекарственных субстанций ряда 1,2,4-триазол-3-илтиоацетатных кислот и их солей методом ВЭЖХ/ДМД-МС / Б.О.Варинский, Е.Г.Кныш, В.В.Парченко, О.И.Панасенко, А.Г.Каплаушенко	
УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ НАЗВАНИЙ ЖУРНАЛОВ И СПРАВОЧНИКОВ	76