

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Acetylpyraziny jako meziprodukty pro syntézu biologicky
aktivních derivátů pyrazinu III.**

Rigorózní práce

Hradec Králové 2005

Mgr. Dana Honcová

RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. děkuji za odborné vedení, cenné rady, podnětné připomínky a všestrannou pomoc při vzniku této rigorózní práce.

Dále děkuji paní V. Hronové za provedení elementárních analýz, paní I. Vencovské za změření IČ spekter, doc RNDr. M. Pourovi, Ph.D. A doc. PharmDr. J. Kunešovi za změření a interpretaci NMR spekter, PharmDr. V. Voříškovi z Fakultní nemocnice v Hradci Králové za změření hmotnostních spekter, PharmDr. J. Jampilkovi, Ph.D. z firmy ZENTIVA za HPLC ověření čistoty produktů, doc. RNDr. V. Buchtovi, CSc. a jeho spolupracovníkům z Katedry biologických a lékařských věd za provedení antifungálních testů a D. R. Richardsonovi, Ph.D., D. Sc. a Ms. D. Kalinowske z Children's Cancer Institute Australia za zhodnocení antineoplastické aktivity.

Výsledky antimykobakteriálních testů byly poskytnuty TAACF (Tuberculosis Antimycobacterial Acquisition Coordinating Facility) na základě smlouvy o výzkumu a vývoji s U. S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

OBSAH

1.	ÚVOD A CÍL PRÁCE	4
2.	TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1.	<i>Struktura a vlastnosti thiosemikarbazonů</i>	5
2.2.	<i>Biologické účinky thiosemikarbazonů</i>	6
2.2.1.	Antivirové účinky	6
2.2.2.	Antineoplastické účinky	7
2.2.3.	Antibakteriální účinky	11
2.2.4.	Antiprotozoální účinky	14
2.2.5.	Antifungální účinky	17
2.2.6.	Anthelmintické a insekticidní účinky	20
2.2.7.	Jiné biologické účinky	21
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1.	<i>Příprava 5-alkylpyrazin-2 karbonitrilů</i>	26
3.1.1.	Obecný postup pro alkylaci pyrazin-2-karbonitrilu	26
3.1.2.	Příprava 5-heptylpyrazin-2-karbonitrilu ve vodě	28
3.1.3.	Příprava 5-heptylpyrazin-2-karbonitrilu ve směsi voda + acetonitril	28
3.2.	<i>Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-onů</i>	30
3.2.1.	Obecný postup pro přípravu 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-onů	30
3.3.	<i>Příprava thiosemikarbazonů</i>	33
3.3.1.	Obecný postup pro reakci 1-arylethan-1-onů s thiosemikarbazidem nebo <i>N,N</i> -dimethylthiosemikarbazidem	33
4.	DISKUSE	37
5.	ZÁVĚR	40
6.	LITERATURA	41
	PŘÍLOHA 1	52
	PŘÍLOHA 2	53

ÚVOD A CÍL PRÁCE

Studium biologicky aktivních derivátů pyrazinu má na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy mnohaletou tradici. Studované sloučeniny jsou odvozeny buď od pyrazin-2-karboxylové kyseliny nebo od 2-acetylpyrazinu (1-pyrazin-2-ylethan-1-onu) a je u nich hodnocena především antifungální a antimykobakteriální aktivita, vliv na fotosyntetické procesy, případně i další biologické účinky [1-17].

Syntézy ve skupině derivátů acetylpyrazinu byly zahájeny v druhé polovině 80. let 20. století a jsou zaměřeny na přípravu acetylpyrazinů substituovaných na jádře [18-22] a dále na přípravu derivátů získaných obměnou acetylové skupiny [13, 15-17, 23-35]. Darzens-Claisenovou kondenzací acetylpyrazinů a ethylesterem monochloroctové kyseliny byly získány odpovídající ethylestery 3-pyrazin-2-yl-2,3-epoxymáselné kyseliny [23, 36]. V dalším období byla věnována pozornost především různým 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onům získaným Claisen-Schmidtovou kondenzací acetylpyrazinů s aromatickými aldehydy [13, 15-17, 23-31]. V současnosti jsou připravovány a biologicky hodnoceny kondenzační produkty acetylpyrazinů s thiosemikarbazidem a *N,N*-dimethylthiosemikarbazidem [32-34] a rhodaninem [35].

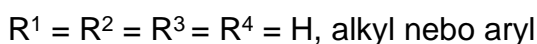
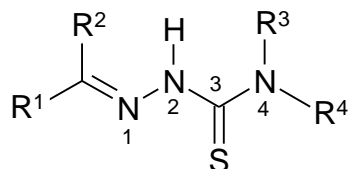
První thiosemikarbazony připravila a popsala ve své rigorózní práci Švandová [32]. V návaznosti na její výsledky byly v mé diplomové práci připraveny thiosemikarbazony acetofenonu, 1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)ethan-1-onu, 1-(5-pentylpyrazin-2-yl)ethan-1-onu, 1-(5-heptylpyrazin-2-yl)ethan-1-onu [33]. Al-Hallak se pak ve své rigorózní práci zabývala přípravou *N,N*-dimethylthiosemikarbazonů [34].

Úkolem mé rigorózní práce je znovu připravit některé 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily a 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-ony, které sice již byly dříve připraveny a použity jako meziprodukty pro syntézu biologicky aktivních derivátů pyrazinu [32, 33], ale z různých důvodů buď nebyly v některých případech získány zcela čisté nebo u nich z časových důvodů nebyla provedena úplná fyzikálněchemická charakterizace. Proto je nutné jejich přípravu zopakovat a doplnit chybějící charakteristiky. Dále bych měla navázat na rigorózní práci L. Al-Hallak [34] a pokračovat v syntéze série 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazonů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

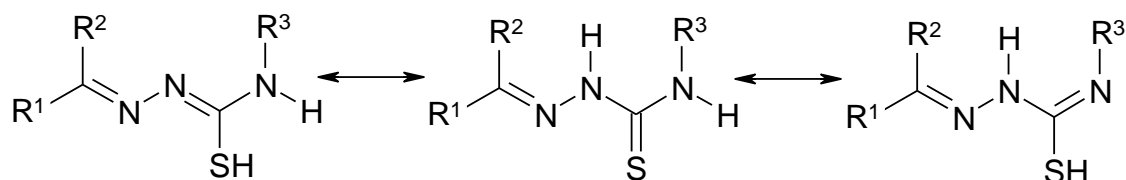
2.1. *Struktura a vlastnosti thiosemikarbazonů*

Thiosemikarbazony jsou kondenzační produkty aldehydů nebo ketonů s thiosemikarbazidem [37]. Jejich strukturu je možno znázornit tímto obecným vzorcem:



Thiosemikarbazony odvozené od aldehydů jsou velmi stálé sloučeniny [38, 39]. Naproti aceton-thiosemikarbazon se snadno rozkládá a může být při přípravě aldehyd-thiosemikarbazonů použit jako činidlo místo volného thiosemikarbazidu. Bis-thiosemikarbazony *o*-dioxosloučenin jsou známy pod názvem thiazony [39].

Thiosemikarbazony obsahují ve své struktuře dvojnou vazbu C=N a mohou existovat ve dvou izomerních formách (*E/Z*). Kromě toho podléhají thioxo/thiol tautomerii:



O určování konfigurace thiosemikarbazonů pomocí spektrálních metod a o vlivu uspořádání jejich molekul na biologickou aktivitu bylo podrobně pojednáno v rigorózní práci M. Švandové [32].

V analytické chemii se thiosemikarbazony používají k charakterizaci aldehydů a ketonů [40]. Důležitá je také jejich schopnost tvořit komplexy s kovy. Využívá se např. při stanovení cytostaticky účinných komplexů platiny v séru a moči [41] nebo stanovení iontů železa ve vodě [42]. V syntetické organické chemii jsou thiosemikarbazony využívány jako meziproducty pro přípravu dalších sloučenin, především různých

heterocyklických sloučenin vznikajících jejich cyklizací [43-46]. Z farmaceuticko-chemického hlediska jsou významné biologické účinky thiosemikarbazonů.

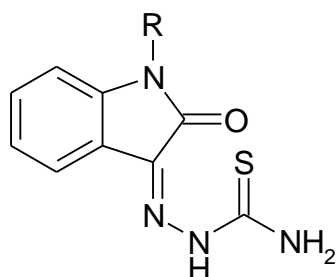
2.2. Biologické účinky thiosemikarbazonů

Přestože thiosemikarbazony patří mezi relativně toxické sloučeniny, našly některé z nich praktické uplatnění v terapii a prevenci život ohrožujících infekcí. V současnosti jsou thiosemikarbazony a jejich komplexy s kovy studovány především jako potenciální antivirotika, antineoplastika a chemoterapeutika bakteriálních infekcí. Některé thiosemikarbazony vykazují dále také antimykobakteriální, antimalarické, antiartritické, antidiabetické, antifungální, neurotropní a antikonvulzivní účinky [34, 47].

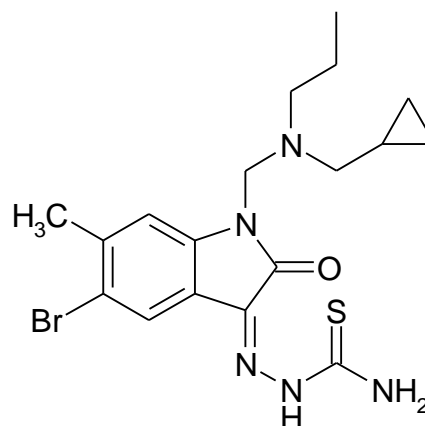
Biologické vlastnosti semikarbazonů a thiosemikarbazonů často souvisejí s vytvářením komplexů s kovy. Tak může být změněna lipofilita, která ovlivňuje množství látky, které je schopno vstoupit do buněk. Komplex s kovem může být také účinnější než samotný ligand, také mohou být zmírněny některé vedlejší účinky. Mohou se také objevit jiné účinky, nebo být snížena vznik lékové rezistence [47].

2.2.1. Antivirové účinky

Domagk a jeho kolegové před více než padesáti lety objevili, že thiosemikarbazony vzkazují účinky proti viru kravských neštovic. Tím byla odstartována éra chemoterapie virových infekcí. U metisazonu (*N*-methylisatin-3-thiosemikarbazonu), který byl původně zkoumán jako tuberkulostatická látka, byl dokonce objeven profylaktický účinek proti infekci pravými neštovicemi. Metisazon byl použit při infekci v Indii. Úspěšné zavedení očkování proti pravým neštovicím používání metisazonu ukončilo. Jiné infekce způsobené poxviry, proti kterým není dostupná očkovací látka, nebo znovu objevení se infekce pravými neštovicemi (některé státy vlastní tajně vzorky viru), však mohou vyžadovat účinnou chemoterapii. Proto by bylo účelné určit mechanismus účinku této látky a pokud by se ukázalo, že metisazon působí selektivně proti poxvirům, připravit také jeho analogy [48]. Ze studií věnovaných této problematice vyplynulo, že isatin-3-thiosemikarbazon (IBT) patrně zasahuje různými mechanismy do procesu transkripce virové RNA a jeho analogy substituované na dusíku aminomethylovou skupinou, např. 5-brom-1-[[[(cyklopropylmethyl)(propyl)-amino]methyl]-6-methyl-1*H*-indol-2,3-dion-3-thiosemikarbazon, jsou vůči poxvirům účinnější a selektivnější než metisazon [49].



metisazon: R = CH₃; IBT: R = H



novější analog metisazonu

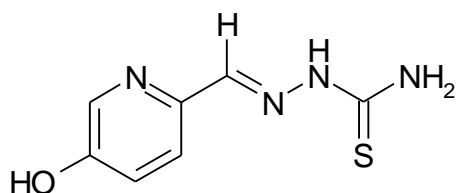
Thiosemikarbazony odvozené od různých karbonylových sloučenin jsou testovány jako potenciální antivirotika i vůči jiným virům, včetně HIV [50-52].

Účinek proti virům je pravděpodobně zprostředkovan několika mechanismy. Thiosemikarbazony mají povahu chelátorů. Jako takové jsou schopny vázat atom kovu. Mohou proto deaktivovat Fe-dependentní ribonukleotidreduktasu, která se podílí na vzniku deoxyribonukleotidů v buňce. Nepřímo tak ovlivňují syntézu RNA a DNA. Inhibice transkripce může být způsobena i přímou vazbou thiosemikarbazonů na nukleové kyseliny. Vyvázáním železa, mědi nebo jiného kovu může být také deaktivován některý z klíčových enzymů účastnících se základních reakcí buněčného metabolismu. Železo například katalyzuje vznik kyslíkatých sloučenin, které aktivují jaderný faktor κB (NF-κB) a ovlivňují tak virovou transkripci [51].

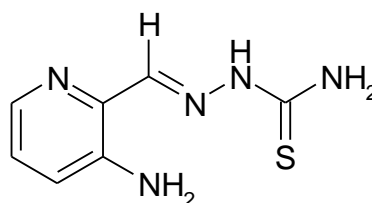
2.2.2. Antineoplastické účinky

U některých thiosemikarbazonů bylo zjištěno, že jsou schopny inhibovat ribonukleotidreduktasu [53]. Ribonukleotidreduktasa (EC 1.17.4.1) katalyzuje syntézu deoxyribonukleotidů z ribonukleotidových prekurzorů a je zodpovědná za dostatečné množství deoxyribonukleotidů pro syntézu DNA. Pro katalytickou aktivitu ribonukleotidreduktasy je nutná přítomnost železa. Mezi aktivitou ribonukleotidreduktasy a replikací nádorových buněk je silná závislost, a proto je tento enzym cílem protinádorové terapie. Nejznámějším a klinicky nejdéle používaným inhibitorem ribonukleotidreduktasy je hydroxymočovina, která inhibuje M2-podjednotku enzymu inaktivací železa nutného pro regeneraci tyrosylového radikálu. Hydroxymočovina však má limitované možnosti použití (nízká afinita

k enzymu, krátký biologický poločas u lidí, vznik rezistence a účinek vůči omezenému spektru nádorů). Gemcitabin a fludarabin inhibují M1-podjednotku ribonukleotidreduktasy. Mezi velmi účinné inhibitory ribonukleotidreduktasy dále patří thiosemikarbazony α -(*N*)-heterocyklických karboxaldehydů (HCT). Jsou to silná chelatační činidla, inhibují tedy M2-podjednotku enzymu. Cheláty HCT s kovy jsou účinnější inhibitory enzymu než samotné HCT a vykazují stejnou účinnost jako hydroxymočovina v 1000krát nižších koncentracích. 5-hydroxypyridin-2-karboxaldehyd-thiosemikarbazon byl již podroben klinickým zkouškám. Tato látka však byla v lidském těle velmi rychle inaktivována a následně eliminována. Proto byly syntetizovány další deriváty HCT, které nejsou tak rychle vylučovány z lidského organismu. Je jím také 3-aminopyridin-2-karboxaldehyd-thiosemikarbazon, známý též jako Triapin[®], který je nyní prochází klinickým zkoušením [54-63].



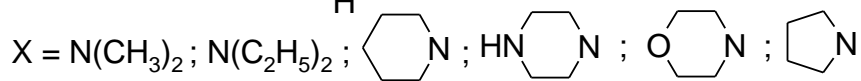
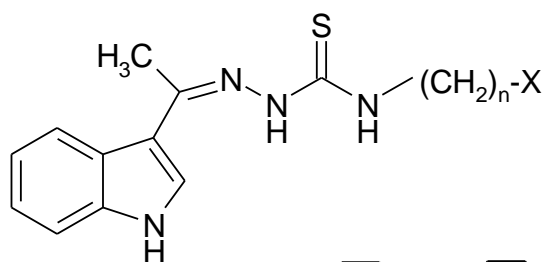
5-hydroxypyridin-2-karboxaldehyd-thiosemikarbazon



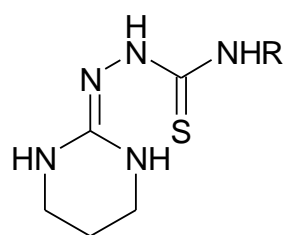
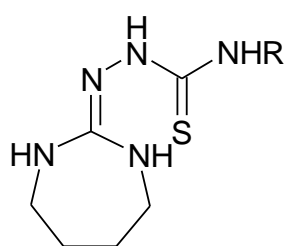
3-aminopyridin-2-karboxaldehyd-thiosemikarbazon (Triapin[®])

Schopnost Triapinu[®] chelatovat železo byla srovnávána s deferoxaminem, který se používá jako chelatační činidlo například při otravách železem. Triapin se ukázal být dvakrát silnějším chelátorem železa než deferoxamin. Bylo také zjištěno, že kromě chelatace železa se na cytotoxickém účinku Triapinu[®] podílí i tvorba reaktivních forem kyslíku [64].

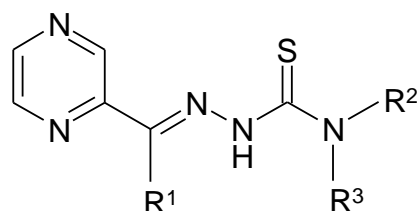
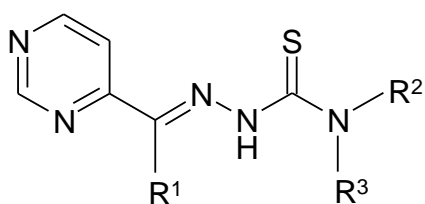
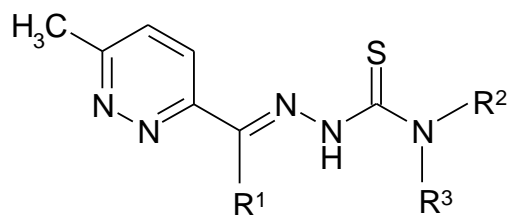
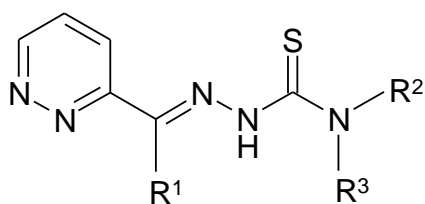
Antineoplastické účinky byly zjištěny u celé řady dalších thiosemikarbazonů odvozených od heterocyklických aldehydů a ketonů, např. 3-acetylundolu [65], tetrahydropyrimidin-2(1H)-onu a 1,3-diazepan-2-onu [66], a různých formyl- a acyldiazinů [67].

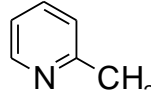


$n = 2 - 3$

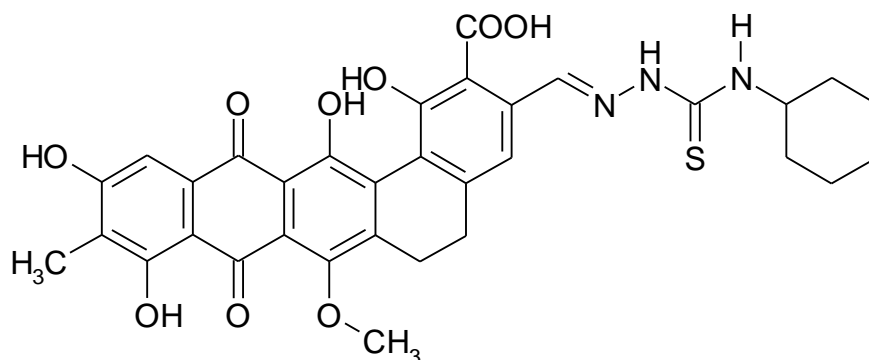


R = methyl; fenyl; *p*-chlorfenyl



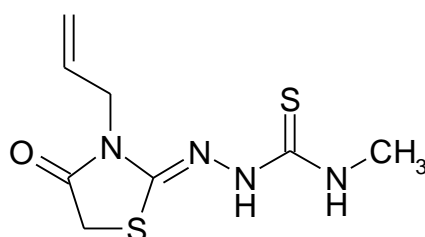
$R^1 = R^2 = H, CH_3; R^3 = H, CH_3, CH_2CH=CH_2,$


Zajímavou sloučeninou je také *N*-cyclohexylthiosemikarbazon. madurahydroxylaktonu, který patří mezi nesteroidní inhibitory estronsulfatasy. Je studován jako potenciální léčivo estrogendependentních karcinomů prsu bez nežádoucích estrogenních účinků a nízkou akutní toxicitou [68].



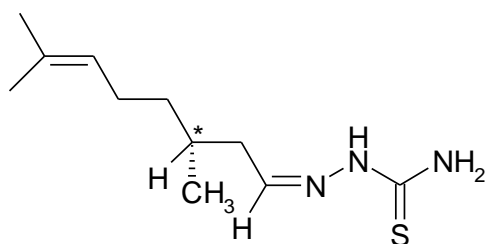
N-cyclohexylthiosemikarbazon madurahydroxylaktonu

Antiproliferativní účinek vůči různým typům nádorů vykazuje i CGP 52608 (*N*-methylthiosemikarbazon 3-allyl-1,3-thiazolidin-2,4-dionu). Cytostatické účinky této sloučeniny jsou zprostředkovány nukleárními receptory RORA (retinoic acid receptor-related orphan receptor α) podobně jako protinádorové působení melatoninu [69-71].

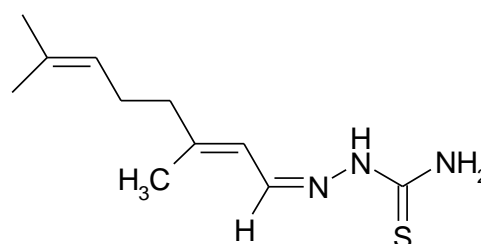


CGP-52608

Thiosemikarbazony odvozené od citronelalu a citralu vykazovaly antimitotickou aktivitu, derivát citronelalu navíc indukoval apoptózu [72].

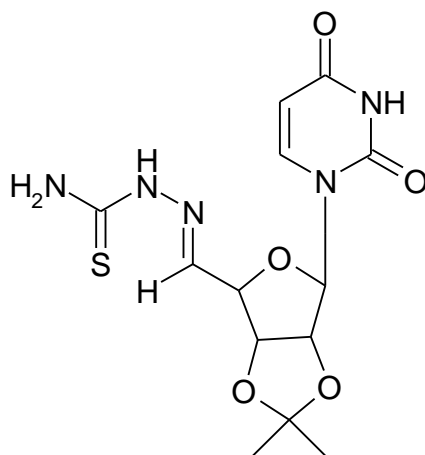


(3*R*)-(+)-citronellal-thiosemikarbazon



citral-thiosemikarbazon

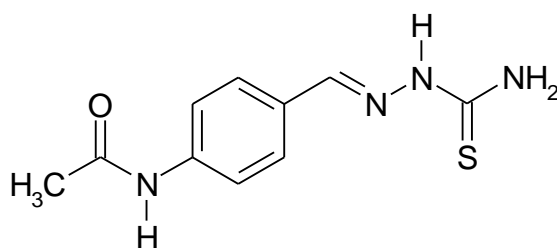
Buněčnou proliferaci inhiboval také thiosemikarbazon odvozený od uridinu, nikoliv však thiosemikarbazony obsahující pouze cukr. Z toho lze soudit, že přítomnost nukleové baze je pro účinek nutná [72].



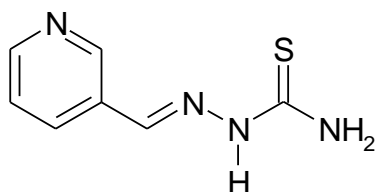
2.2.3. Antibakteriální účinky

Thiosemikarbazony a jejich komplexy s kovy vykazují široké spektrum antimikrobiální aktivity. Praktický význam má jejich inhibiční účinek na mykobakterie.

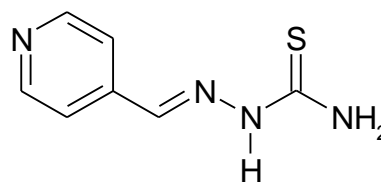
Sloučeniny, které obsahují ve své molekule seskupení $-CSNH-$, tvoří důležitou skupinu antituberkulotik. Vedle thiokarbanilidů a thioamidů jsou to i thiosemikarbazony. Thiosemikarbazony alifatických aldehydů a ketonů nebyly v terapii pro svoji vysokou toxicitu využity. Z derivátů benzaldehydu se dodnes používá thioacetazon (thiosemikarbazon 4-acetamidobenzaldehydu) Z aldehydů pyridinové řady našly praktické uplatnění nikothiazon a isonikotinaldehyd-thiosemikarbazon [73]. Nikothiazon je dnes opět studován pod označením SRI-286 jako potenciální léčivo infekcí vyvolaných organismy komplexu *Mycobacterium avium* [74, 75].



thioacetazon

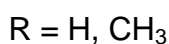
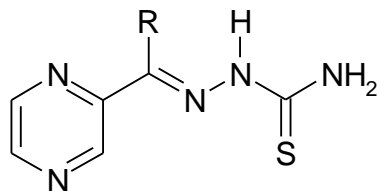


nikothiazon

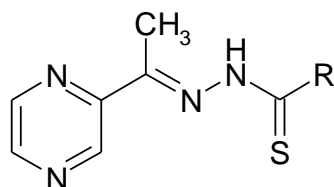


isonikotinaldehyd-thiosemikarbazon

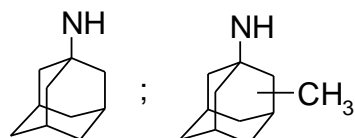
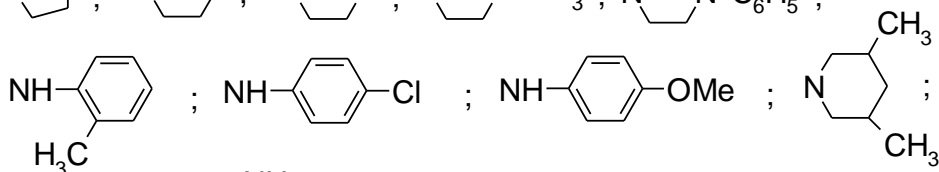
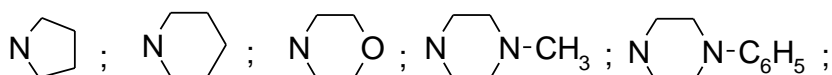
V padesátých letech 20. století Kushner se spolupracovníky [76] připravili thiosemikarbazony acetylpyrazinu a formylpyrazinu. Jejich antituberkulotická aktivita byla hodnocena na myších a bylo zjištěno, že obě sloučeniny jsou toxické a jen málo účinné.



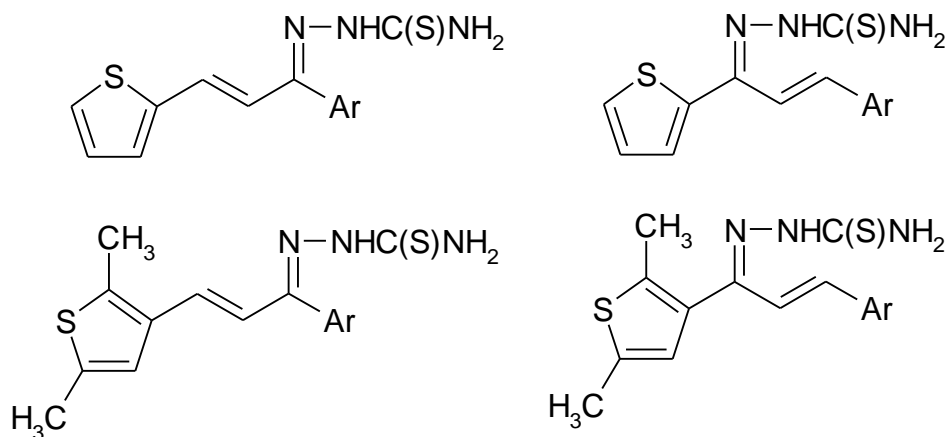
Později se Milzcarska a kol. zabývali *N*⁴-substituovanými thiosemikarbazony acetylpyrazinu. V antimykobakteriálních testech *in vitro* byla nejlepší aktivita zjištěna u sloučeniny v níž R = pyrrolidin-1-yl. Tento derivát byl potom hodnocen na myších infikovaných kmenem H₃₇Rv v dávkách 1mg/kg a 5mg/kg. Jeho aktivita a toxicita byly srovnatelné s isoniazidem a ethambutolem, které byly použity jako pozitivní kontroly [77].



R = N(CH₃)₂; NHCH(CH₃)CH₃; NH(CH₂)_nOH; NHCH(C₂H₅)OH; NHCH₂CH₂NH₂

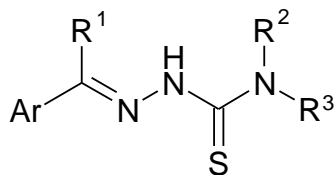


Tuberkulostatické účinky byly popsány také u thiosemikarbazonů odvozených od thiofenových analogů chalkonu [78].



Ar = (subst.)fenyl; naftyl; (subst.)-2-thienyl

V 70. a 80. letech 20. století byly jako potenciální antituberkulotika a antileprotika studovány různé thiosemikarbazony 2-acetylpyridinu, 2-acetylchinolinu a 1-acetyl- a 3-acetylisochinolinu. Kromě antimykobakteriálních účinků byl u nich prokázán také inhibiční vliv na *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Staphylococcus aureus*. Vůči gramnegativním mikroorganismům byly méně účinné [79-85].



Ar = 2-pyridyl; 6-methyl-2-pyridyl; 2-chinolyl; 1-isochinolyl; 3-isochinolyl

R¹ = CH₃; hydroxyalkyl

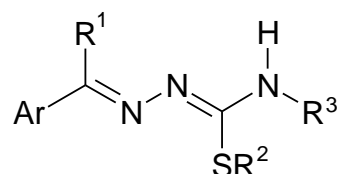
R² = alkyl; cykloalkyl; alkenyl; alkynyl; adamantyl; (subst.)naftyl; (subst.)benzyl; (subst.)fenyl; pyridyl; thienyl; indolyl; furyl; akridinyl; chinolyl; pyridazinyl

R³ = H nebo R³ = R², nebo NR²R³ uzavírají kruh

Ve studii věnované bakteriostatickým účinkům thiosemikarbazonů a jejich komplexů s přechodnými kovy bylo zjištěno, že pro bakteriostatickou aktivitu je nutná přítomnost heteroatomu v sousedství karbonylové skupiny výchozího aldehydu nebo ketonu. Komplexy s kovy jsou účinnější než volné ligandy a působí odlišným mechanismem [86].

Antibakteriální účinky vůči grampozitivním mikroorganismům mají také isothiosemikarbazony studované italskými autory [87, 88]. V nedávné době byla hodnocena i antimykobakteriální účinnost těchto sloučenin a bylo zjištěno, že jsou vůči

Mycobacterium avium účinnější než v praxi používaná antituberkulotika a v kombinaci s rifampicinem nebo rifabutinem působí synergicky [89, 90].



Ar = 5-nitro-2-furyl; (subst.)fenyl; 3-pyridyl; 4-pyridyl

R¹ = H; CH₃

R² = alkyl; allyl; (subst.)benzyl;

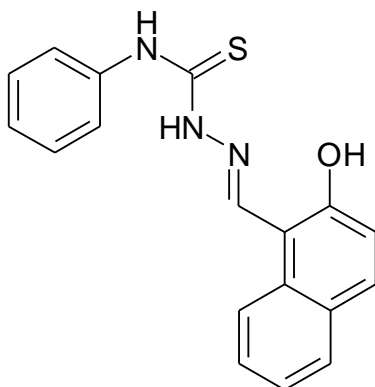
R³ = H; CH₃; allyl

2.2.4. Antiprotozoální účinky

V poslední třetině minulého století probíhal v USA rozsáhlý screeningový program zaměřený na nalezení nových antimalarik. V rámci tohoto programu byly intenzivně studovány i výše uvedené thiosemikarbazony 2-acetylpyridinu, 2-acetylchinolinu a 1-acetyl- a 3-acetylisochinolinu [84, 91-100]. Thiosemikarbazony 2-acetylpyridinu byly in vitro účinné také vůči *Trypanosoma rhodesiense* [101]. I když žádná z těchto sloučenin nebyla zavedena do praxe, přispěly tyto studie významně k prostudování vztahů mezi strukturou thiosemikarbazonů a jejich účinností. Podobně jako v případě antibakteriálních účinků bylo zjištěno, že nejlepší účinky mají N⁴,N⁴-disubstituované thiosemikarbazony odvozené od 2-acetylheterocyklů. Odpovídající semikarbazony jsou méně účinné. Thiosemikarbazony 2-(α -hydroxyacetyl)pyridinu jsou lépe rozpustné ve vodě, méně toxické pro hostitele, avšak také méně účinné vůči plasmodiím; jejich antibakteriální účinky byly srovnatelné s odpovídajícími deriváty 2-acetylpyridinu [84]. Vyšší homology odvozené od 2-propionyl-, 2-butyryl a 2-(2-methylpropionyl)pyridinu byly v testech na myších rovněž méně toxické [99]. Snížení toxicity za současného snížení aktivity bylo pozorováno i u thiosemikarbazonů 2-acetylpyridin-1-oxidu [98]. Thiosemikarbazidy vzniklé redukcí thiosemikarbazonů naopak byly antimalaricky účinnější, avšak také toxičtější [95]. Komplexace thiosemikarbazonů s přechodnými kovy vedla ke snížení antimalarické účinnosti a k zesílení antileukemické aktivity [94].

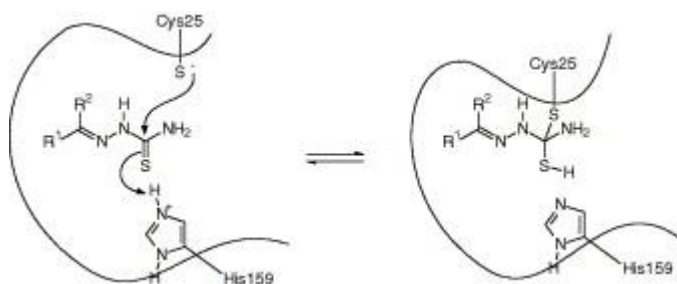
I když v tehdejší době ještě nebylo možné plně vysvětlit mechanismus antiprotozoálního působení thiosemikarbazonů, předpokládali autoři, že jejich

antiparazitární aktivity souvisí s jejich schopností chelatovat železo nutné pro správnou funkci některých parazitárních enzymů [98, 101]. Novější studie tento jejich předpoklad potvrzují [102, 103]. Ze sloučenin, jejichž antiprotozoální účinky jsou dány chelatací železa, je možno jako příklad uvést 2-hydroxynaftaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazon [102].



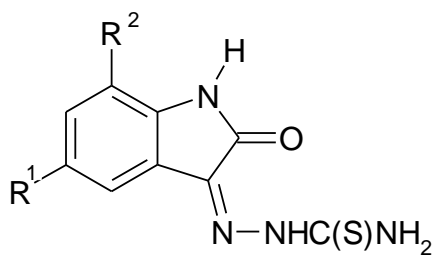
2-hydroxynaftaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazon

Dalším z možných mechanismů účinků je inhibice protozoálních cysteinových proteas (kruzainu, falcipainu-2 a rhodesainu) [104-108]. Obr. 1 znázorňuje interakci thiosemikarbazonu s kruzainem.



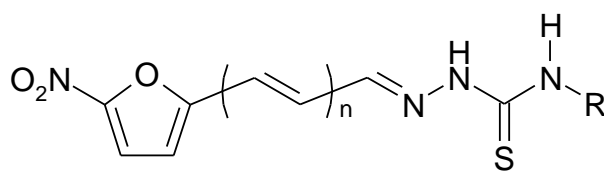
Obr. 1: Mechanismus inhibice kruzainu thiosemikarbazonem (převzato z literatury [107])

Jako inhibitory protozoálních cysteinových proteas jsou studovány např. deriváty isatinu [105], 5-nitrofuralddehydu [107] a halogenovaných (fenyl)(alkyl)ketonů [108].



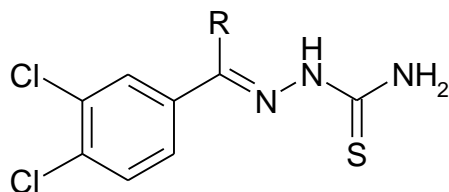
$R^1 = \text{H}; \text{CH}_3; \text{F}; \text{Cl}; \text{Br}; \text{I}; \text{NO}_2$

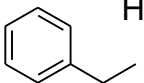
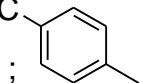
$R^2 = \text{H}; \text{CH}_3$

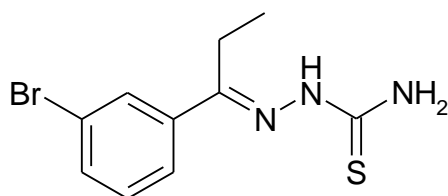
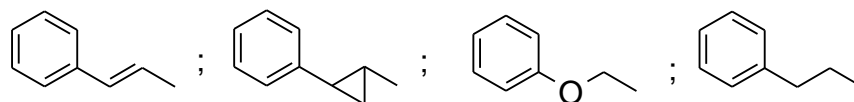


$n = 0$ nebo 1

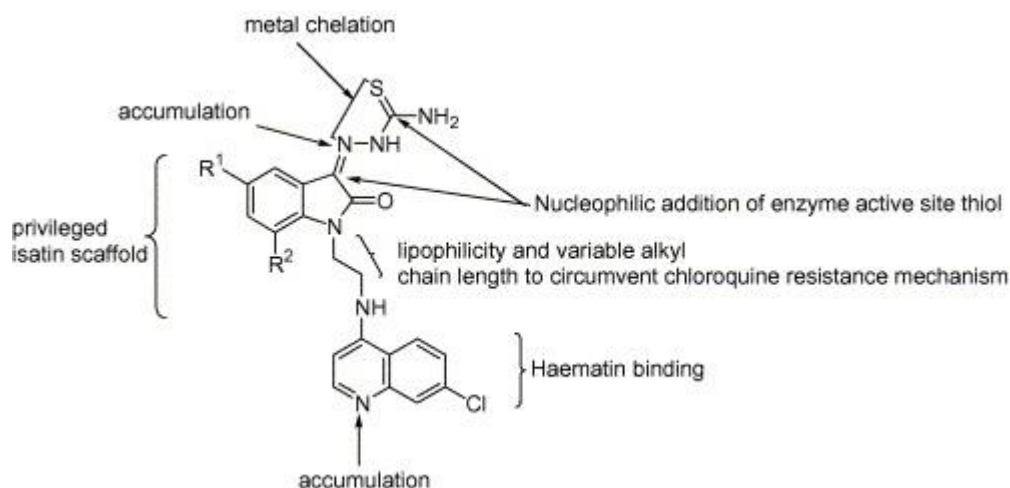
$R = \text{H}; \text{methyl}; \text{ethyl}; \text{fenyl}$



$R = \text{ethyl}; \text{butyl}; \text{terc-butyl}; \text{cyklohexyl};$  ;  ;

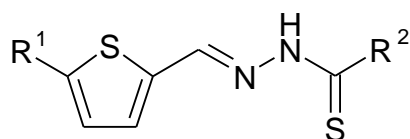


Zajímavými potenciálními antimalariky jsou také sloučeniny tvořené kombinací isatin-thiosemikarbazonu s prakticky používaným chlorochinem [109]. U sloučenin tohoto typu se předpokládá kombinovaný mechanismus účinku znázorněný na Obr. 2.



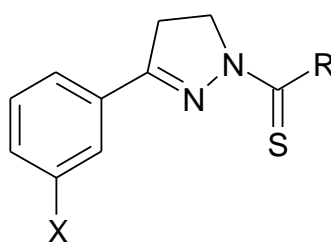
Obr. 2: Struktura a předpokládané mechanismy účinku nového typu potenciálních antimalarik (převzato z literatury [109])

Thiosemikarbazony jsou účinné i proti jiným protozoím, např. *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* a *Trichomonas vaginalis*. Na těchto druzích byly testovány např. thiosemikarbazony odvozené od 5-thiofen-2-karbaldehydu [110-114] a deriváty pyrazolinu, v nichž je hydrazonová část thiosemikarbazonu součástí heterocyklu [115].



$R^1 = \text{H}; \text{NO}_2$

$R^2 =$ zbytek primárního nebo sekundárního alifatického nebo alicyklického aminu;



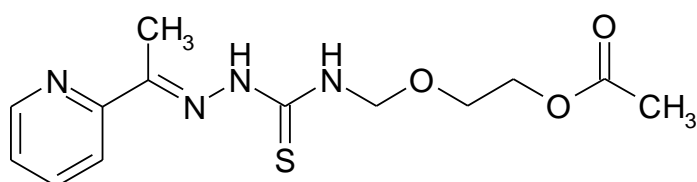
$X = \text{H}; \text{Cl}; \text{Br}$

$R =$ zbytek primárního nebo sekundárního alifatického aminu

2.2.5. Antifungální účinky

Velký počet publikovaných prací je věnován také antifungálním účinkům thiosemikarbazonů a jejich komplexů s kovy. Nejintenzivněji studovanou skupinou jsou

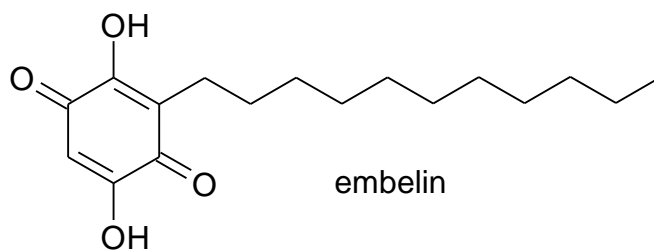
thiosemikarbazony α -(*N*)-heterocyklických karbaldehydů a ketonů, především pyridin-2-karboxaldehydu a 1-pyridin-2-ylethan-1-onu (2-acetylpyridinu) [116-125]. V roce 1986 byly připraveny 2-acetoxyethoxymethyl deriváty thiosemikarbazonů a thioamocovin a byly u nich prokázány antimikrobiální účinky vůči grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*), gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), kvasinkám (*Candida albicans*) a plísním (*Aspergillus niger*). Nejúčinnější z připravených derivátů byl 2-acetylpyridin-*N*⁴-(2-acetoxyethoxymethyl)thiosemikarbazon [126]. Nedávno byla publikována studie věnovaná počítačovému modelování interakce této sloučeniny s humánní, bakteriální (*E. coli*) a fungální (*C. albicans*) dihydrofolátreduktasou. Z této studie vyplynulo, že se jedná o nekompetitivní inhibitor, který se na enzym váže ve vazebném místě pro NADPH (koenzym dihydrofolátreduktasy). Je to první inhibitor dihydrofolátreduktasy, u kterého byl zjištěn tento způsob vazby na enzym. Zároveň je jeho afinita k dihydrofolátreduktase z *C. albicans* vyšší než afinita k humánnímu enzymu. Rozdíly jsou i vazbě na enzym z *C. albicans* a *E. coli*. Tyto poznatky by se mohly stát východiskem pro další studie zaměřené na vývoj antibakteriálních a antifungálních léčiv [127].



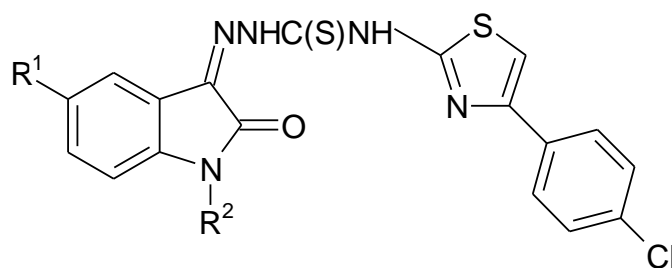
2-acetylpyridin-*N*⁴-(2-acetoxyethoxymethyl)thiosemikarbazon

Ze sloučenin uvedených v přechozích částech v souvislosti s jinými účinky byly antigungální vlastnosti prokázány také u thiosemikarbazonů odvozených od thiofenových analogů chalkonu [78], antibakteriálně účinných isothiosemikarbazonů [87, 88] a jejich cyklických analogů [128, 129].

Inhibiční účinky vůči houbám jsou popsány u thiosemikarbazonů odvozených od 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu [130], 3,4,5-trimethoxybenzaldehydu [131] a 5-methyl-2-furaldehydu [132] a embelinu [133].

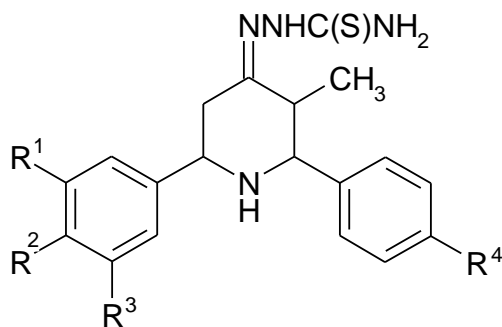


Zajímavými thiosemikarbazony s antifungálními účinky jsou dále deriváty isatinu [50, 134-135] a deriváty 4-piperidonu [136].



$R^1 = \text{H}; \text{Cl}; \text{Br}$

$R^2 = \text{H}; \text{dimethylaminomethyl}; \text{piperidin-1-ylmethyl};$
 morfolinylmethyl

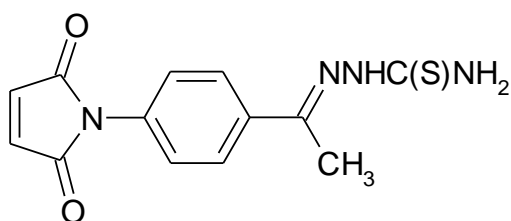


$R^1 = R^3 = \text{H}; \text{OCH}_3$

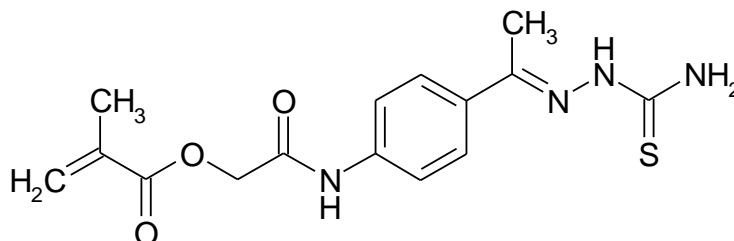
$R^2 = \text{H}; \text{CH}_3; \text{OCH}_3; \text{N}(\text{CH}_3)_2$

$R^4 = \text{Cl}; \text{OH}$

Thiosemikarbazon *N*-(4-acetylfenyl)maleimidu inhibuje růst *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Účinné jsou i sloučeniny vzniklé jeho polymerizací [137]. Také polymery odvozené od thiosemikarbazonu [2-(4-acetylfenyl)amino]-2-oxoethyl-methakrylátu [138].



thiosemikarbazon *N*-(4-acetylphenyl)maleimidu

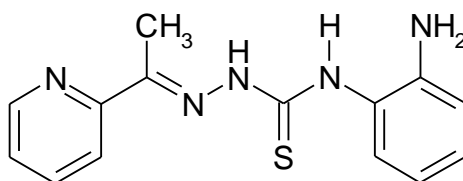


thiosemikarbazon [2-(4-acetylphenyl)amino]-2-oxoethyl-methakrylátu

2.2.6. Anthelmintické a insekticidní účinky

Protiinfekční a protiinvazní spektrum thiosemikarbazonů zahrnuje také červy a hmyz, i když počet testů provedených na těchto organismech je podstatně menší než v případě virů, mikrobů, protozoí, hub a nádorových buněk.

Již několikrát zmíněné thiosemikarbazony 2-acetylpyridinu byly testovány jako potenciální makrofilaricidní léčiva proti *Brugia pahangi*, *Acanthocheilonema viteae*, *Onchocerca gutturosa* a *Onchocerca volvulus*. Nejúčinnějším derivátem testované série byl 2-acetylpyridin-*N*⁴-(2-aminofenyl)thiosemikarbazon [139].



1-pyridin-2-ylethan-1-on-*N*-(2-aminofenyl)thiosemikarbazon

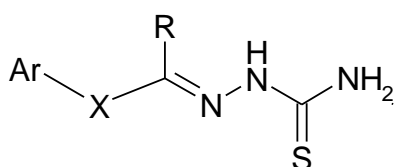
Také ostatní anthelminticky účinné thiosemikarbazony byly testovány na původcích filariózy a onchocerkiózy. Tyto studie však byly publikovány v obtížně dostupných primárních zdrojích a přesné struktury testovaných sloučenin nelze proto uvést [133, 140-143].

Insekticidní aktivita byla hodnocena pouze u thiosemikarbazonů odvozených od 2-acetylpyridinu. Tyto sloučeniny zabraňují housenkám druhu *Oncopeltus fasciatus*

svléknout kutikulu a dospět [144,145]. Současně s těmito studii bylo provedeno i hodnocení jejich toxicity pro ptáky [146].

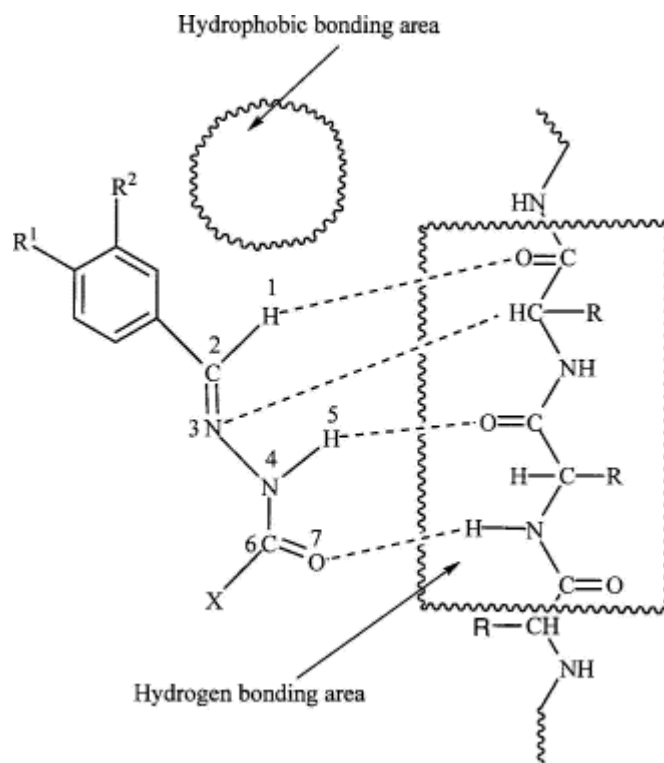
2.2.7. Jiné biologické účinky

Mezi další z účinků thiosemikarbazonů patří aktivity neurotropní, především antikonvulzivní. Lukevics a kol. [147] studovali neurotropní účinky thiosemikarbazonů odvozených od heterocyklických aldehydů a ketonů pomocí několika testů na myších. Nejvyšší centrálně tlumivou aktivitu měly thiosemikarbazony pyridinové řady s postranním řetězcem v poloze 2 a 4. 2-acetylpyridin-thiosemikarbazon vykazoval v těchto testech vysokou akutní toxicitu. Náhrada pyridinového kruhu thiofenem nebo furanem vedla ke snížení toxicity. 5-methyl-2-furaldehyd-thiosemikarbazon byl ze všech studovaných sloučenin nejméně aktivní. Na rozdíl od thiosemikarbazonů odvozených od (aryl)(alkyl)ketonů, které byly účinné pouze v MES (Maximum Electroshock Seizures) testu, měly heterocyklické analogy protektivní účinek i vůči křečím navozeným pentetrazolem. Dále byl u nich pozorován vliv na dopaminergní struktury, snížení amfetaminových účinků a vliv na paměťové procesy dané jejich atihypoxickým účinkem. Kromě účinků centrálně tlumivých byla ve studii potvrzena i antidepressivní aktivita studovaných thiosemikarbazonů [147].



Ar = 2-pyridyl; 3-pyridyl; 4-pyridyl;
5-methyl-2-thienyl; 5-methyl-3-thienyl;
5-brom-2-thienyl; 5-brom-3-thienyl;
5-methyl-2-furyl
X = CH=CH; CH(OH)CH₂
R = H; CH₃

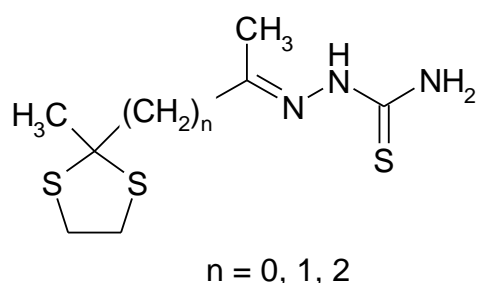
Antikonvulzivními účinky thiosemikarbazonů a jejich analogů (acetylhydrazonů, oxamoylhydrazonů a semikarbazonů) se již několik let podrobně zabývají Dimmock se spolupracovníky [148-153]. Na základě jejich studií byl navržen model vazebného místa, zahrnující oblast hydrofobních interakcí a oblast vodíkových vazeb (Obr. 3). Předpokládá se, že vazebné místo je součástí peptidového řetězce. Substituent X by měl mít elektron-donorové vlastnosti, aby došlo ke zvýšení schopnosti tvořit vodíkové můstky. V poloze 1 je výhodnější vodík než methylová skupina. Lepší účinnost tedy mají deriváty aldehydů [153].



Obr. 3: Předpokládaná interakce nově studovaných antiepileptik s vazebným místem
(převzato z literatury [153])

Antikonvulzivní účinky byly studovány také u thiosemikarbazonů odvozených od 1-(3-aryl-2-propenoyl)-4-oxopiperidinů [154], isatinu [155-157], chinazolonu [158, 159].

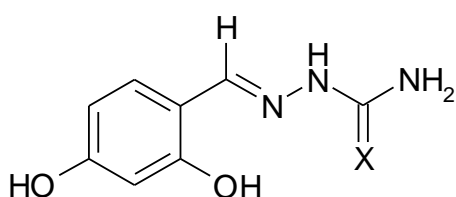
Protože ozáření vysokými dávkami ionizačního záření může vést ke zvýšené dráždivosti CNS a ke křečím, hledali Taroua se spolupracovníky sloučeniny, které by kromě radioprotektivních vlastností měly i účinky antikonvulzivní. Toho se podařilo dosáhnout u některých thiosemikarbazonů odvozených od ketonů s 1,3-dithiolanovým cyklem [160].



Studie zabývající se dalšími účinky thiosemikarbazonů byly publikovány jen ojediněle. Podobně jako jiné sloučeniny s thiomocovinovým seskupením mohou

thiosemikarbazony ovlivňovat činnost štítné žlázy a působit jako anti-thyreoidální látky [161].

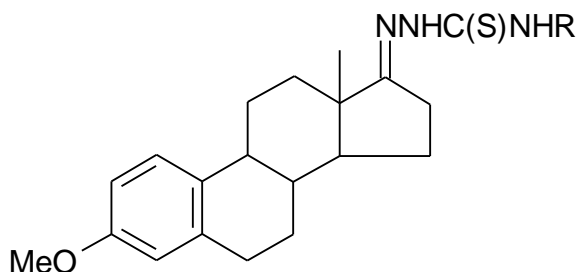
Thiosemikarbazony jsou také sirnými analogy pimagedinu (aminoguanidinu). Ten je v současnosti intenzivně studován jako inhibitor glykace proteinů a potenciální léčivo pozdních diabetických komplikací. Předpokládá se, že mechanismus účinku aminoguanidinu spočívá v ochraně tkání před škodlivými účinky oxidačního stresu. U 2,4-dihydroxybenzaldehyd-thiosemikarbazonu byla před časem prokázána schopnost inhibovat v koncentraci 1 mmol.l^{-1} peroxidaci lipidů. Jeho účinnost byla jen o málo slabší než aktivita odpovídajícího aminoguanidinového derivátu [162].



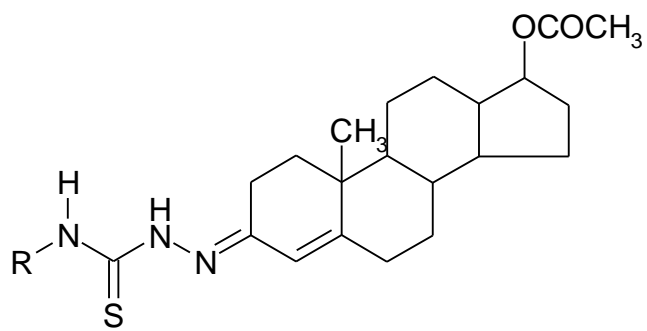
2,4-dihydroxybenzaldehyd-thiosemikarbazon: X = S

2,4-dihydroxybenzylideneaminoguanidin: X = NH

V rámci studií zaměřených na biologickou aktivitu různých derivátů steroidních hormonů bylo zjištěno, že u thiosemikarbazonů estron-3-methyletheru je estrogení aktivita zachována, ale ve srovnání s estradiol-benzoátem nižší. Ve skupině androgenů měly thiosemikarbazony testosteron-acetátu vyšší androgenní aktivitu než testosteron. Anabolickou aktivitu měl pouze *N*⁴-(2-methylfenyl)thiosemikarbazon testosteron-acetátu [163].



R = H; butyl; ; benzyl; fenyl



R = H; butyl; fenyl; 2-methylfenyl; 2-methoxyfenyl

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Sloupcové chromatografie byly prováděny „flash“ technikou za použití akvarijního motorku jako přetlaku.

TLC chromatografie byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice). Jako mobilní fáze byla používána směs benzín + ethyl-acetát 80:20 (v/v).

Vzorky látek pro analýzu byly sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku Bötia a nebyly korigovány.

Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

Čistota produktů byla ověřena pomocí HPLC za těchto podmínek:

Separční modul: Waters Alliance 2695 XE s chromatografickým softwarem Millennium³²® Chromatography Manager Software, Waters 2004

Kolona: Symmetry[®] C₁₈ 5 μm, 4.6 × 250 mm

Mobilní fáze: methanol + voda 50:50 (v/v), průtok 0,9 ml/min, nástřik 30 μl

Detekce: Waters Photodiode Array Detector 2996, 210 nm

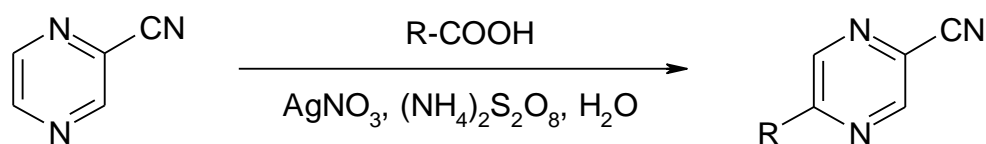
IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET IMPACT 400. Vlnočty jsou uváděny v cm⁻¹.

¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-V_xBB 300. Chemické posuny jsou uváděny v δ, ppm a interakční konstanty *J* v Hz.

Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji FINNIGAN MAT Magnum technikou plynové chromatografie ve spojení s hmotovou detekcí (GC/MS) na principu iontové pasti s vnitřní elektronovou ionizací. Separace byla provedena na koloně ZB5 (Phenomenex, Inc.), 30m × 0,25 mm × 0,25 μm, jako mobilní fáze bylo použito helium 4.5 plus SIAD.

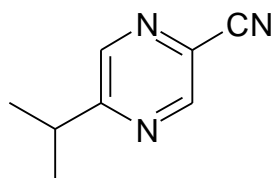
3.1. Příprava 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů

3.1.1. Obecný postup pro alkylation pyrazin-2-karbonitrilu



10,50 g pyrazin-2-karbonitrilu (0,1 mol) se rozpustí ve 300 ml vody zahřáté na 80 °C. K tomuto roztoku se přidá 1,70 g (0,01mol) dusičnanu stříbrného a 0,1 mol kyseliny. Za stálého míchání se pak pomalu přikapává roztok 25,10 g (0,11 mol) peroxidisíranu amonného v 70 ml vody. Teplota se udržuje v rozmezí 75 – 80 °C. Při této teplotě se směs míchá celkem 1 hodinu. Po zchlazení reakční směsi se pH upraví na 9 – 10 přidáním 10% roztoku hydroxidu sodného a směs se kontinuálně extrahuje diethyletherem. Etherový výtřepok se vysuší bezvodým síranem sodným. 5-alkylpyrazin-2-karbonitril se ze směsi oddělí sloupcovou chromatografií na silikagelu (Silica gel 60, Fluka, 0,063 – 0,2mm) za použití směsi benzín + ethyl-acetát 80:20 jako eluentu a dočistí se destilací za sníženého tlaku. Tímto postupem byly připraveny tyto produkty:

5-isopropylpyrazin-2-karbonitril



Molekulová hmotnost: 147,18 (C₈H₉N₃)

Výtěžek: 47 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 100 – 102 °C/1,60 kPa

Čistota: 99,23 %

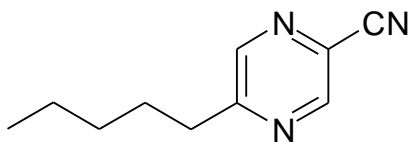
IČ spektrum (CHCl₃): 2239 (CN)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 8,81d, 1H, *J* = 1,7 (H-3); 8,58d, 1H, *J* = 1,7 (H-6); 3,26 – 3,11m 1H, 1,34d, 6H, *J* = 6,9 (isopropyl)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 166,0;147,4;144,1; 128,0; 115,7; 34,4; 21,7

EIMS *m/z* (%):148 (M⁺, 84), 32 (100), 119 (14), 105 (9), 52 (10)

5-pentylpyrazin-2-karbonitril



Molekulová hmotnost: 175,23 (C₁₀H₁₃N₃)

Výtěžek: 46 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 118 – 125 °C/1,33 kPa

Čistota: 99,31 %

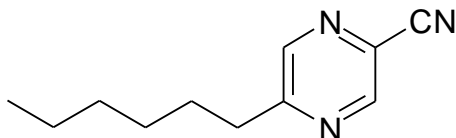
IČ spektrum (CHCl₃): 2240 (CN)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 8,81d, 1H, *J* = 1,5 (H-3); 8,55d, 1H, *J* = 1,5 (H-6); 2,89t, 2H, *J* = 7,4, 1,84 – 1,70m, 2H, 1,42 – 1,26m, 4H, 0,89t, 3H, *J* = 7,4 (pentyl)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 161,7; 147,4; 145,2; 127,9; 115,7; 35,8; 31,3, 28,6; 22,3; 13,9

EIMS *m/z* (%):176 (M⁺, 72), 146 (7), 132 (19), 119 (100)

5-hexylpyrazin-2-karbonitril



Molekulová hmotnost: 189,26 (C₁₁H₁₅N₃)

Výtěžek: 38 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 125 – 127 °C/1,33 kPa

Čistota: 91,63 %

IČ spektrum (CHCl₃): 2240 (CN)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 8,81d, 1H, *J* = 1,5 (H-3); 8,56d, 1H, *J* = 1,5 (H-6); 2,89t, 2H, *J* = 7,4, 1,82 – 1,69m, 2H, 1,43 – 1,21m, 6H, 0,87t, 3H, *J* = 7,4 (hexyl)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 161,7; 147,4; 145,2; 127,9; 115,7; 35,9; 31,4; 28,9; 28,7; 22,4; 14,0

EIMS *m/z* (%):190 (M⁺, 52), 160 (5), 146 (6), 132 (17), 119 (100)

3.1.2. Příprava 5-heptylpyrazin 2-karbonitrilu ve vodě

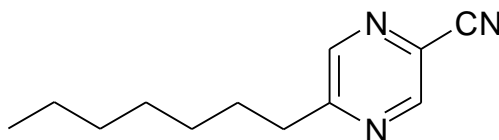
Probíhala výše uvedeným obecným postupem, ale etherový extrakt obsahoval zbytky nezreagované oktanové kyseliny, kterou nebylo možné odstranit destilací. Při opakované přípravě byl etherový extrakt před chromatografií protřepán 10% roztokem Na_2CO_3 . Po sloupcové chromatografii bylo získáno 5,90 g (29 %) nažloutlé kapaliny. Takto získaný produkt byl destilován s vodní parou, ale došlo k jeho částečné hydrolyze na 5-heptylpyrazin-2-karboxamid.

3.1.3. Příprava 5-heptylpyrazin-2-karbonitrilu ve směsi voda + acetonitril

Probíhala výše uvedeným obecným postupem, ale místo 300 ml destilované vody byla použita směs 150 ml vody a 150 acetonitrilu. Po skončení reakce byl acetonitril oddestilován, pH vodného roztoku bylo upraveno na 9 – 10 přidáním 10% roztoku hydroxidu sodného a směs byla kontinuálně extrahována diethyletherem. Etherový výtěpek byl vysušen bezvodým síranem sodným a podroben sloupcové chromatografii. Bylo získáno 9,60 g (47 %) nažloutlé kapaliny. Po změření NMR bylo zjištěno, že stejně jako v předcházejícím případě je takto získaný produkt směsí požadovaného 5-heptylpyrazin-2-karbonitrilu a nezreagované oktanové kyseliny. Po rozpuštění v etheru a protřepání 10% roztokem Na_2CO_3 bylo získáno pouze 4,50 g (22 %) nažloutlé kapaliny.

Při opakované přípravě byl etherový extrakt před chromatografií protřepán 10% roztokem Na_2CO_3 a po chromatografii bylo získáno 6,05 g (30 %) nažloutlé kapaliny, z níž byl destilací získán produkt pro fyzikálněchemickou charakterizaci:

5-heptylpyrazin-2-karbonitril



Molekulová hmotnost: 203,28 ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3$)

Výtěžek: 30 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 135 – 140 °C/1,33 kPa

Čistota: 98,68 %

IČ spektrum (CHCl_3): 2240 (CN)

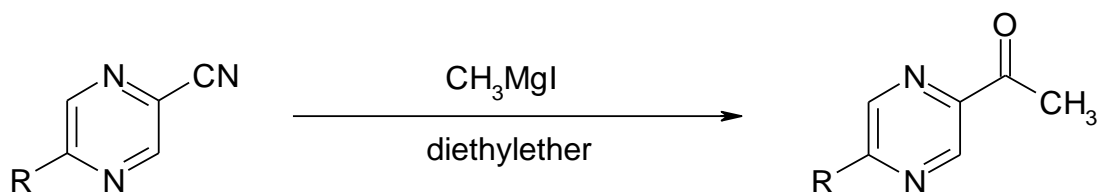
$^1\text{H-NMR}$ spektrum (300 MHz, CDCl_3): δ 8,80d, 1H, $J = 1,4$ (H-3); 8,55d, 1H, $J = 1,4$ (H-6); 2,89t, 2H, $J = 7,4$, 1,82 – 1,65m, 2H, 1,42 – 1,19m, 8H, 0,86t, 3H, $J = 7,4$ (heptyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ spektrum (75 MHz, CDCl_3): δ 161,7; 147,4; 145,2; 127,9; 115,7; 35,8; 31,6; 29,1; 28,9; 28,9; 22,5; 14,0

EIMS m/z (%): 204 (M^+ , 100), 119 (19)

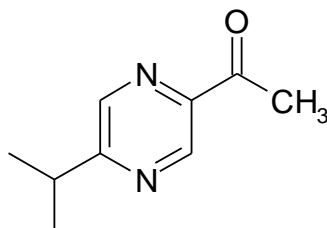
3.2. Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-onů

3.2.1. Obecný postup pro přípravu 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-onů



Ke 49,90 g (0,3 mol) methylmagnesiumjodidu ve 200 ml absolutního etheru se za míchání a při teplotě -10 až $+10$ °C přikape roztok pyrazin-2-karbonitrilu (0,128 mol) v 50 ml absolutního etheru. Při uvedené teplotě se směs míchá celkem 1 hodinu a potom se rozloží opatrným vylitím na led. Vyloučená sraženina se částečně rozpustí přidáním 50 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné objemově 1:1 a směs se kontinuálně extrahuje diethyletherem. Etherový extrakt se vysuší bezvodým síranem sodným a ether se oddestiluje. Produkt se přečistí destilací za sníženého tlaku. Tímto postupem byly připraveny následující produkty:

1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)ethan-1-on



Molekulová hmotnost: 164,20 ($C_9H_{12}N_2O$)

Výtěžek: 56 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: $105 - 106$ °C/1,60 kPa

Čistota: 91,12 %

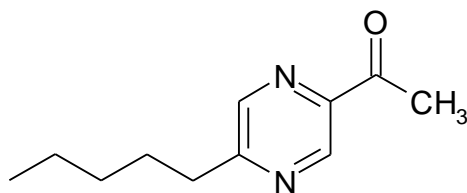
IČ spektrum ($CHCl_3$): 1697 (C=O)

1H -NMR spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9,12d, 1H, $J = 1,4$ (H-3); 8,50d, 1H, $J = 1,4$ (H-6); 2,68s, 3H, ($COCH_3$); 3,27 – 3,11m, 1H, 1,35d, 6H, $J = 7,1$ (isopropyl)

^{13}C -NMR spektrum (75 MHz, $CDCl_3$): δ 199,3; 165,9; 145,6; 142,6; 141,7; 34,3; 25,8; 22,0

EIMS m/z (%): 164 (M^+ , 44), 149 (100), 136 (74), 121 (52), 107 (31), 94 (18), 80 (12), 67 (15), 52 (28)

1-(5-pentylpyrazin-2-yl)ethan-1-on



Molekulová hmotnost: 192,26 (C₁₁H₁₆N₂O)

Výtěžek: 30 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 120 – 125 °C/1,33 kPa

Čistota: 67,67 %

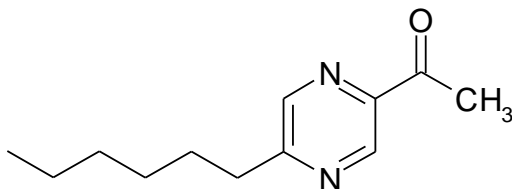
IČ spektrum (CHCl₃): 1698 (C=O)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 9,11d, 1H, *J* = 1,4 (H-3); 8,47d, 1H, *J* = 1,4 (H-6); 2,68s, 3H, (COCH₃); 2,87t, 2H, *J* = 7,4, 1,83 – 1,69m, 2H, 1,42 – 1,27m, 4H, 0,88t, 3H, *J* = 7,4 (pentyl)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 199,4; 161,7; 145,4; 143,0; 142,7; 35,7; 31,4; 28,9; 25,8; 22,4; 13,9

EIMS *m/z* (%): 193 (M⁺, 100), 136 (7), 121 (16)

1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on



Molekulová hmotnost: 206,28 (C₁₂H₁₈N₂O)

Výtěžek: 57 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 127 – 130 °C/1,46 kPa

Čistota: 91,55 %

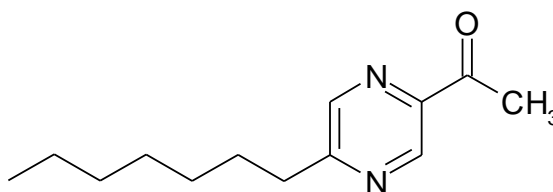
IČ spektrum (CHCl₃): 1697 (C=O)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 9,12d, 1H, *J* = 1,4 (H-3); 8,47d, 1H, *J* = 1,4 (H-6); 2,69s, 3H, (COCH₃); 2,88t, 2H, *J* = 7,4, 1,83 – 1,68m, 2H, 1,43 – 1,21m, 6H, 0,87t, 3H, *J* = 7,4 (hexyl)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 199,4; 161,6; 145,4; 143,0; 142,7; 35,7; 31,5; 29,2; 28,9; 25,8; 22,5; 14,0

EIMS m/z (%): 207 (M^+ , 100), 177 (6), 163 (7), 149 (16), 136 (90), 121 (43), 107 (6)

1-(5-heptylpyrazin-2-yl)ethan-1-on



Molekulová hmotnost: 220,31 ($C_{13}H_{20}N_2O$)

Výtěžek: 26 %

Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 152 – 162 °C/1,20 kPa

Čistota: 91,83 %

IČ spektrum ($CHCl_3$): 1701 (C=O)

1H -NMR spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9,11d, 1H, $J = 1,4$ (H-3); 8,46d, 1H, $J = 1,4$ (H-6); 2,68s, 3H, ($COCH_3$); 2,87t, 2H, $J = 7,2$, 1,82 – 1,67m, 2H, 1,40 – 1,17m, 8H, 0,85t, 3H, $J = 7,2$ (heptyl)

^{13}C -NMR spektrum (75 MHz, $CDCl_3$): δ 199,3; 161,6; 145,4; 143,0; 142,7; 35,7; 31,6; 29,3; 29,2; 29,1; 25,8; 22,6; 14,0

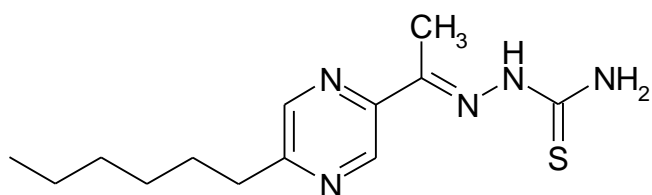
EIMS m/z (%): 221 (M^+ , 26), 149 (20), 136 (100), 121 (30), 53 (7)

3.3. Příprava thiosemikarbazonů

3.3.1. Obecný postup pro reakci 1-arylethan-1-onů s thiosemikarbazidem nebo *N,N*-dimethyl-thiosemikarbazidem

0,01 mol příslušného 1-arylethan-1-onu a 0,01 mol thiosemikarbazidu nebo *N,N*-dimethyl-thiosemikarbazidu se rozpustí v 10 – 15 ml methanolu. Po přidání tří kapek 99% kyseliny octové se směs zahřívá 5 hodin do varu. Produkt se odsaje, promyje vodou a překrystalizuje z vhodného rozpouštědla. Tímto postupem byly připraveny následující produkty:

1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-thiosemikarbazon



Molekulová hmotnost: 279,40 (C₁₃H₂₁N₅S)

Výtěžek: 34 %

Vzhled: bezbarvé, lesklé krystaly

Teplota tání: 158 – 160 °C (za rozkladu)

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	55,88	7,58	25,07	11,48
Nalezeno:	53,59	7,49	24,16	17,06

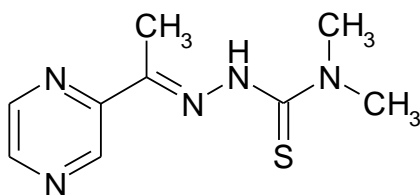
Čistota: 99,05 %

IČ spektrum (KBr): 1612 (C=N)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 10,40bs, 1H (NH); 9,50d, 1H, *J* = 1,4 (H-3); 8,47d, 1H, *J* = 1,4 (H-6); 8,41bs, 1H (NH₂); 8,23bs, 1H (NH₂); 2,34s, 3H (CH₃); 2,76t, 2H, *J* = 7,6, 1,71 – 1,56m, 2H, 1,38 – 1,17m, 6H, 0,83t, 3H, *J* = 6,9 (hexyl)

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO): δ 179,3; 156,6; 147,8; 146,7; 142,4; 142,3; 34,4; 31,2; 28,8; 28,4; 22,2; 14,1; 12,1

1-pyrazin-2-ylethan-1-on-N,N-dimethylthiosemikarbazon



Molekulová hmotnost: 223,30 (C₉H₁₃N₅S)

Výtěžek: 44 %

Vzhled: žlutooranžové krystaly

Teplota tání: 162 – 165 °C (za rozkladu)

Elementární analýza:

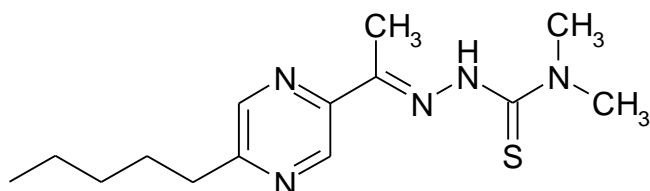
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	48,41	5,87	31,36	14,36
Nalezeno:	48,22	5,90	31,54	13,88

Čistota: 98,63 %

IČ spektrum (KBr): 1609 (C=N)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 9,80bs, 1H (NH); 9,21d, 1H, *J* = 1,4 (H-3); 8,63 – 8,60m, 1H (H-5); 8,59d, 1H, *J* = 2,5 (H-6); 2,35s, 3H (CH₃); 3,31s, 6H (N(CH₃)₂)

1-(5-pentylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-N,N-dimethylthiosemikarbazon



Molekulová hmotnost: 293,43 (C₁₄H₂₃N₅S)

Výtěžek: 11 %

Vzhled: žluté, lesklé krystaly

Teplota tání: 217 – 220 °C (za rozkladu)

Elementární analýza:

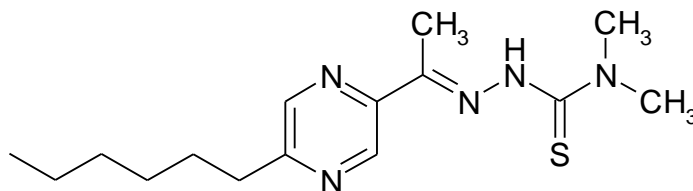
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	57,30	7,90	23,87	10,93
Nalezeno:	54,07	7,28	29,60	10,09

Čistota: 98,79 %

IČ spektrum (KBr): 1592, 1612 (C=N)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 11,50bs, 1H (NH); 9,02s, 1H (H-3); 8,44s, 1H (H-6); 2,28s, 3H (CH₃); 2,96s, 6H (N(CH₃)₂); 2,74t, 2H, $J = 7,6, 1,76 - 1,57$ m, 2H, 1,39 – 1,17m, 4H, 0,84t, 3H, $J = 6,5$ (pentyl)

1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-N,N-dimethylthiosemikarbazon



Molekulová hmotnost: 307,46

Výtěžek: 15 %

Vzhled: žluté, lesklé krystaly

Teplota tání: 206 – 209 °C (za rozkladu)

Elementární analýza:

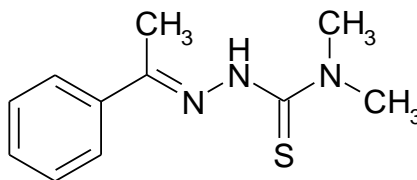
	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	58,60	8,20	22,78	10,43
Nalezeno:	54,65	7,38	28,06	9,67

Čistota: 98,53 %

IČ spektrum (KBr): 1592, 1612 (C=N)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 11,50bs, 1H, (NH); 9,02d, 1H, $J = 1,5$ (H-3); 8,44d, 1H, $J = 1,5$ (H-6); 2,28s, 3H, (CH₃); 2,96s 6H (N(CH₃)₂); 2,73t, 2H, $J = 7,6, 1,75 - 1,55$ m, 2H, 1,36 – 1,16m, 6H, 0,83t, 3H, $J = 6,9$ (hexyl)

1-fenylethan-1-on-N,N-dimethylthiosemikarbazon



Molekulová hmotnost: 221,32 (C₁₁H₁₅N₃S)

Výtěžek: 14 %

Vzhled: světle žluté krystaly

Teplota tání: 243 – 247 °C (za rozkladu)

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	59,69	6,83	18,99	14,49
Nalezeno:	55,08	5,90	26,85	13,01

Čistota: 99,04 %

IČ spektrum (KBr): 1591, 1609 (C=N)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 11,07bs, 1H (NH); 7,75 – 7,67m, 2H (H-2 a H-6); 7,44 – 7,28m, 3H (H-3, H-4 a H-5); 2,25s, 3H (CH₃); 2,94s, 6H (N(CH₃)₂)

4. DISKUSE

Prvním úkolem mé rigorózní práce bylo znovu připravit některé 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily a 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-ony. Tyto sloučeniny sice již byly na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv dříve připraveny a použity jako meziprodukty pro syntézu biologicky aktivních derivátů pyrazinu [28, 33], ale v některých případech nebyly získány zcela čisté. Bylo proto nutné jejich přípravu zopakovat a doplnit chybějící charakteristiky.

Příprava 5-isopropylpyrazin-2-karbonitrilu, 5-pentylpyrazin-2-karbonitrilu a 5-hexylpyrazin-2-karbonitrilu probíhala bez problémů dříve vypracovaným postupem [19], avšak při přípravě 5-heptylpyrazin-2-karbonitrilu jsem narazila na problémy způsobené špatnou rozpustností oktanové kyseliny ve vodě. Nezreagovaná kyselina byla promíšena s olejovitým produktem, při alkalizaci reakční směsi nebyla převedena na sodnou sůl a znečišťovala etherový extrakt. Zbytky nezreagované kyseliny pak nebylo možné dokonale odstranit ani při sloupcové chromatografii, ani při destilaci, takže etherový výtřepok musel být před dalším čištěním zbaven zbytků kyseliny oktanové protřepáním s roztokem uhličitanu sodného. Protože alkylované pyrazin-2-karbonitrily mají vysoké teploty varu a obtížně se destilují, pokusila jsem se produkt predestilovat s vodní parou. Tento způsob se však ukázal jako nevhodný, protože při něm došlo hydrolyze produktu. V další fázi práce jsem provedla alkylation ve směsi voda + acetonitril. Předpokládala jsem, že úpravou reakčních podmínek by mohl být problém se špatnou rozpustností kyseliny oktanové překonán a mohlo by být dosaženo vyššího výtěžku. Prakticky se však ukázalo, že přídavek acetonitrilu do reakčního prostředí neměl na průběh reakce a konečný výtěžek žádný vliv.

Získané 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily pak byly podrobeny Grignardově reakci za vzniku odpovídajících 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-onů. V této části práce se nevyskytly žádné závažné problémy.

Vzhledem k tomu, že 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily a 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-ony jsou většinou viskózní kapaliny nebo nízko tající pevné látky, nebylo možné provést u nich elementární analýzu. Místo toho byla změřena EIMS (Electron Impact Mass Spectrometry) spektra. Skutečnost, že hodnota molekulového iontu M^+ vychází ve většině případů o jednotku vyšší než vypočítaná molekulová hmotnost je dána použitou metodikou (iontová past s vnitřní ionizací) a lze ji vysvětlit zakřivením elektromagnetického pole. IČ i NMR spektra ve všech případech potvrzují

předpokládanou strukturu. Čistota připravených produktů byla ověřena pomocí HPLC a je vyhovující (> 90 %). Vzorek 1-(5-pentylpyrazin-2-yl)ethan-1-onu obsahoval pouze 67,67 % požadovaného produktu, což je patrně způsobeno nedokonalým oddestilováním balastních látek. Lze předpokládat, že redestilací produkt by se čistota výrazně zvýšila. Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů byla již publikována formou plakátového sdělení – příloha č. 1 [164].

Kondenzaci 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-onů s thiosemikarbazidem a *N,N*-dimethylthiosemikarbazidem jsem rovněž prováděla dříve vyzkoušeným postupem [32-34]. Získané produkty jsem čistila krystalizací z bezvodého ethanolu. Výtěžky produktů jsou uvedeny po první krystalizaci. Výsledky elementární analýzy nebyly vyhovující ani při opakované krystalizaci z ethanolu. Proto jsem každý produkt překrystalizovala z acetonu a na závěr ještě jednou z bezvodého ethanolu. Ani potom však výsledky CHNS analýzy nebyly v souladu s vypočtenými hodnotami, a to ani v případě, že byl vzorek spalován s přidavkem katalyzátoru (V_2O_5). Jelikož nebylo možné vyloučit, že chybné výsledky nebyly způsobeny vadou přístroje, byla čistota připravených sloučenin ověřena pomocí HPLC a bylo zjištěno, že vzorky jsou velmi čisté (98,53 až 99,05 %).

V infračervených spektrech připravených thiosemikarbazonů a *N,N*-dimethylthiosemi-karbazonů chybí absorpční pásy v oblasti $2600-2550\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají SH skupinám [165]. Na základě toho lze soudit, že získané sloučeniny existují v pevném stavu (KBr) v thioxo-formě. Vibrace charakteristická pro C=S skupinu se u thiosemikarbazonů popsaných v literatuře [65, 152, 160, 165, 166] nachází v oblasti 1410 cm^{-1} až 1190 cm^{-1} . V této oblasti je u sloučenin popsaných v této práci větší počet absorpčních pásů, takže je obtížné jednoznačně rozhodnout, který z nich odpovídá thioxo skupině. Zajímavá je skutečnost, že absorpční pás odpovídající C=N vazbě se u dříve připravených thiosemikarbazonů s odpovídajícím alkylem na pyrazinovém jádře [32-34] a u 1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-thiosemikarbazonu nachází kolem 1610 cm^{-1} , avšak u *N,N*-dimethylthiosemikarbazonů (s výjimkou 1-pyrazin-2-ylethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazonu) je tato vibrace posunuta do oblasti kolem 1590 cm^{-1} a případně doprovázena méně výrazným signálem při $1609-1612\text{ cm}^{-1}$. Tento posun a rozštěpení pásu mohou být způsobeny vlivem methylových skupin na koncovém dusíku nebo přítomností obou možných izomerů (*E*, *Z*) ve vzorku. Pokud by vzorek byl směsí obou izomerů, byly by v NMR spektru pozorovány zdvojené signály. Podle literatury [165, 167] se signál odpovídající NH protonu

hydrazonové skupiny nachází u *Z*-izoméru v oblasti δ 14,45 – 15,05 ppm, zatímco pro *E*-izomér v oblasti δ 9,59 – 12,90 ppm. U sloučenin popsanych v mé rigorózní práci je signál tohoto protonu v rozmezí δ 9,80 – 11,50 ppm. Připravené sloučeniny jsou tedy *E*-izoméry. ^{13}C -NMR spektra *N,N*-dimethylthiosemikarbazonů bohužel nebyla interpretovatelná, protože pro jejich zaznamenání je potřeba poměrně vysoká koncentrace sloučeniny a velmi dlouhá doba, během které docházelo k postupnému vylučování látky z DMSO.

Připravené thiosemikarbazony jsou testovány jako potenciální antimykotika, antituberkulotika a antineoplastika. U thiosemikarbazonů připravených v rigorózní práci M. Švandové [32], v méj diplomové práci [33] a u 1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-thiosemikarbazonu popsaneho v kapitole 3.3.1 bylo již biologické hodnocení provedeno a výsledky byly publikovány formou posteru – příloha 2 [168]. U *N,N*-dimethylthiosemikarbazonů popsanych v rigorózní práci L. Al-Hallak [34] a v této rigorózní práci biologické hodnocení právě probíhá a po jeho dokončení budou výsledky publikovány.

5. ZÁVĚR

Ve své rigorózní práci jsem připravila tyto 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily:

- 5-isopropylpyrazin-2-karbonitril
- 5-pentylpyrazin-2-karbonitril
- 5-hexylpyrazin-2-karbonitril
- 5-heptylpyrazin-2-karbonitril

Grignardovou reakcí pak byly získány následující acetylpyraziny:

- 1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)ethan-1-on
- 1-(5-pentylpyrazin-2-yl)ethan-1-on
- 1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on
- 1-(5-heptylpyrazin-2-yl)ethan-1-on

Kondenzací acetylpyrazinů s thiosemikarbazidem a *N,N*-dimethylthiosemikarbazidem byly připraveny tyto finální produkty:

- 1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-thiosemikarbazon
- 1-pyrazin-2-ylethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazon
- 1-(5-pentylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazon
- 1-(5-hexylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazon

1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazon byl již dříve popsán v diplomové práci L. Al-Hallak [34] a 1-(5-heptylpyrazin-2-yl)ethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazon nebyl zatím syntetizován, protože výchozí 1-(5-heptylpyrazin-2-yl)ethan-1-on se podařilo připravit jen v malém množství.

Kondenzací *N,N*-dimethyl thiosemikarbazidu s acetofenonem byl na závěr připraven:

- 1-fenylethan-1-on-*N,N*-dimethylthiosemikarbazon

Výsledky dosažené v mé rigorózní práci byly již částečně publikovány [164,168]

6. LITERATURA

1. VONTOR, T. a kol.: Antituberculotics. XXXII. Functional derivatives of 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid. *Česk. Farm.* **1985**, *34*, 74-78.
2. VONTOR, T. a kol.: Antituberculotics. XXXIV. Functional derivatives of 6-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid. *Česk. Farm.* **1985**, *34*, 441-442.
3. VONTOR, T. a kol.: Functional derivatives of 3-alkyl-2-pyrazinecarboxylic acid. *Česk. Farm.* **1986**, *35*, 162-167.
4. VONTOR, T. a kol.: Anthelmintic agents. II. Substituted anilides and thioanilides of 2-pyrazinecarboxylic acids. *Česk. Farm.* **1989**, *38*, 393-397.
5. DLABAL, K. a kol.: Preparation of some 6-substituted *N*-pyrazinyl-2-pyrazinecarboxamides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1993**, *58*, 452-454.
6. DOLEŽAL, M. a kol.: Synthesis and antituberculotic activity of some substituted 3-arylamino-5-cyano-2-pyrazinecarboxamides. *Collect. Czech Chem. Commun.* **1995**, *60*, 1236-1241.
7. DOLEŽAL, M. a kol.: Synthesis and antituberculotic properties of some substituted pyrazinecarbothioamides. *Collec. Czech Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1102-1108.
8. HARTL, J. a kol.: Synthesis and antituberculotic activity of 5-alkyl-6-chloro-2-pyrazinecarboxamides and corresponding thioamides. *Collect. Czech Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1109-1114.
9. DOLEŽAL, M. a kol.: Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.-Chem. Zvesti* **1999**, *53*, 126-130.
10. DOLEŽAL, M. a kol.: Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids: synthesis and biological activity. *Molecules* **2002**, *7*, 363-373.
11. DOLEŽAL, M. a kol.: Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.-Chem. Zvesti* **2000**, *54*, 245-248.
12. KRINKOVÁ, J. a kol.: Synthesis and biological activity of 5-alkyl-6-(alkylsulfanyl)- or 5-alkyl-6-(arylsulfanyl)pyrazine-2-carboxamides and corresponding thioamides. *Farmaco* **2002**, *57*, 71-78.
13. OPLETALOVÁ, V. a kol.: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* **2002**, *57*, 135-144.
14. DOLEŽAL, M. a kol.: Substituted 5-arylpipazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco* **2003**, *58*, 1105-1111.
15. VÍCHOVÁ, P. a kol.: Synthesis and biological evaluation of 2',5'-diazachalcones VIII. Cytotoxicity of 2-OH and 4-OH derivatives. Book of Abstracts of 32nd Conference Synthesis and Analysis of Drugs, Velké Karlovice, September 16 – 19, 2003, p.153.
16. JUN, D. a kol.: Platelet antiaggregating activity of 2',5'- diazachalcones. Book of Abstracts of the 3rd International Symposium on Natural Drugs, Naples, October 2 – 4, 2003, p. 152.

17. OPLETAL, L. a kol.: Platelet antiaggregating activity of substituted (*E*)-3-(3-hydroxyphenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. Book of Abstracts of the Joint Meeting of the Czech Pharmaceutical Society, German Pharmaceutical Society and Austrian Pharmaceutical Society, Regensburg, October 6 – 9, 2004, p. 121.
18. OPLETALOVÁ, V. a kol.: Homolytic acetylation of 2,5-dimethylpyrazine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, *60*, 1551-1554.
19. OPLETALOVÁ, V. a kol.: 5-Alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-Alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-Alkyl-2-acetylpyrazines as Synthetic Intermediates for Antiinflammatory Agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1093-1101.
20. DOMONHEDO, C.: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva III. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1997, 58 s.
21. OPLETALOVÁ, V. a kol.: Homolytic Acetylation of 2-Pyrazinecarbonitrile. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **1999**, *24*, 29-32.
22. ŠVANDOVÁ, M.: Acetylpyraziny jako meziproducty pro syntézu biologicky aktivních derivátů pyrazinu I. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2001, 57 s.
23. OPLETALOVÁ, V.: Studium možností přípravy potenciálních antiflogistik na bázi pyrazinu. Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1996, 149 s.
24. MELTROVÁ, D.: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva IV. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 1997, 67 s.
25. PETERKA, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva I. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2000, 48 s.
26. OPLETALOVÁ, V. a kol.: Conformational Analysis of 2-Hydroxy-2',5'-diazachalcones. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 55-59.
27. CHLUPÁČOVÁ, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2001, 63 s.
28. POSLEDNÍKOVÁ, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva III. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2002, 69 s.
29. POSLEDNÍKOVÁ, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva IV. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2003, 50 s.
30. DUŠKOVÁ, L.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva V. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2004, 50 s.
31. DOSEDĚL, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VI. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2005, 43 s.
32. ŠVANDOVÁ, M.: Thiosemikarbazony acetylpyrazinů jako potenciální antimykotika a antituberkulotika I. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2002, 45 s.
33. ZOBALOVÁ, D.: Acetylpyraziny jako meziproducty pro syntézu biologicky aktivních derivátů pyrazinu II. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2003, 55 s.
34. AL-HALLAK, L.: Thiosemikarbazony acetylpyrazinů jako potenciální antimykotika a antituberkulotika II. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2005, 45 s.

35. DOLEŽEL, J.: Kondenzační produkty acetylpyrazinů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2004, 64 s.
36. OPLETALOVÁ, V. a kol: Ethyl 3-(5-alkyl-2-pyrazinyl)-2,3-epoxybutanoates as intermediates for the synthesis of potential antiinflammatory Agents. Symposium on Heterocyclic Compounds: Synthesis, Structure, and Biological Activity. Hradec Králové, June, 28 – July, 1 1995. In: *Folia Pharm. Univ. Carol.* **1995**, 18 (Suppl.), 171.
37. ČERVINKA, O. a kol. Chemie organických sloučenin. 2. díl. 1.vyd. SNTL, Praha 1987, 1052 s.
38. BAYER, O.: Functionelle Derivate der Aldehyde. In: *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Band 7/1. Sauerstoffverbindungen II. Teil 1. Aldehyde.* Müller, E. (Edit.). 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1954, s. 413-488.
39. BÖGEMANN, M a kol.: Methoden zur Herstellung von schwefelhaften Kohensäurederivaten. In: *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Band 9. Schwefel-, Selen-, Tellurverbindungen.* Müller, E. (Edit.). 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955, s. 781-915.
40. SVOBODOVÁ, D. a kol.: *Analýza organických látek*, 1. vyd. SPN, Praha 1975, 155 s.
41. KHUHAWAR, M. Y. a kol.: Liquid chromatographic determination of cis-platin as platinum(II) in pharmaceutical preparations, serum and urine samples of cancer patients. *Talanta* **2005**, 66, 34-39.
42. ABSALAN, G. a kol.: Simultaneous kinetic determination of Fe(II) and Fe(III) based on their reactions with NQT4S in micellar media by using PLS and PCR methods. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 531, 293-298.
43. MAMOLO, M. G. A kol.: Synthesis and antimicrobial activity of some 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Farmaco* **1996**, 51, 71-74.
44. MUSTAFA, S. M. a kol.: Synthesis of 1,2,4-triazoles and thiazoles from thiosemicarbazide and its derivatives. *Mini Rev. Org. Chem.* **2004**, 1, 375-385.
45. VENKATESWARLU, P. a kol.: Synthesis and pharmacological evaluation of heterocycles from benzocycloheptenones. *Ind. J. Chem. Sect B – Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2005**, 44, 783-788.
46. TENROIO, R. P. a kol.: Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-Toxoplasma gondii activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2575-2578.
47. BERALDO, H. a kol.: The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, 4, 31-39.
48. NEYTS, J. a kol.: Therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections: historical background and perspectives. *Antiviral Res.* **2003**, 57, 25-33.
49. PIRRUNG, M. C. a kol.: Combinatorial optimization of Isatin- β -thiosemicarbazones as anti-poxvirus agents. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3045-3050.
50. PANDEYA, S. N. a kol.: Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and *N*-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, 9, 25-31.
51. VAN ASBECK, B. S. a kol.: Anti-HIV effect of iron chelators: Different mechanisms involved. *J. Clin. Virol.* **2001**, 20, 141-147.

52. GARCIA, C. G. a kol.: Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication in vitro. *Antivir. Chem. Chemother.* **2003**, *14*, 99-105.
53. AGRAWAL K. C. a kol.: The Chemistry and Biological Activity of α -(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. In: *Prog. Med. Chem. Vol. 15*. Ellis G. P., West G. P. (Edits.). North-Holland Publishing Co., Amsterdam 1978, s. 321-356.
54. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 6. 2-Acetylpyridine and 2-butyrylpyridine thiosemicarbazones as antileukemic agents. *Arzneim.-Forsch.* 1983, *33*, 909-912.
55. LIU, M. C. a kol.: Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2586-2593.
56. FINCH, R. A. a kol.: Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumour activity. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 983-991.
57. LI, J. a kol.: Syntheses and antitumour activities of potent inhibitors of ribonucleotide reductase: 3-amino-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AMP), 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP), and its water-soluble prodrugs. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 121-133.
58. FEUN, L. a kol.: Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *50*, 223-229.
59. GILES, F. J. a kol.: Phase I and pharmacodynamic study of Triapine, a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in patients with advanced leukemia. *Leuk. Res.* **2003**, *27*, 1077-1083.
60. MURREN, J. a kol.: Phase I and pharmacokinetic study of triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, administered daily for five days in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 4092-4100.
61. YEN, Y. a kol.: A phase I trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone in combination with gemcitabine for patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *54*, 331-342.
62. WADLER, S. a kol.: Phase I and pharmacokinetic study of the ribonucleotide reductase inhibitor, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, administered by 96-hour intravenous continuous infusion. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 1553-1563.
63. ATIEH, D. M. a kol.: A phase II trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*(Suppl.), 92S.
64. CHASTON, T. B. a kol.: Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: Multiple cellular targets and the different mechanisms of action of Triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 402-414.
65. SIASTRA-PAPASTAIKOU, T. a kol.: Synthesis of new alkylaminoalkyl thiosemicarbazones of 3-acetylindole and their effect on DNA synthesis and cell proliferation. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 107-114.

66. KREŽEL, I.: Semi- and thiosemicarbazones of cyclic 1,3-diamines.: *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* **1998**, *55*, 125-128.
67. EASMON, J. a kol.: Novel thiosemicarbazones derived from formyl- and acyldiazines: Synthesis, effect on cell proliferation, and synergism with antiviral agents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3288-3296.
68. JÜTTEN, P. a kol.: A novel type of nonsteroidal estrone sulfatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1339-1342.
69. WINCZYK, K. a kol.: Melatonin and RZR/ROR receptor ligand CGP 52608 induce apoptosis in the murine colonic cancer. *J. Pineal. Res.* **2001**, *31*, 179-182.
70. KARÁSEK, M. a kol.: Melatonin inhibits growth of diethylstilbestrol-induced prolactin-secreting pituitary tumor in vitro. Possible involvement of nuclear RZR/ROR receptors. *J. Pineal. Res.* **2003**, *34*, 294-296.
71. HERRERA, F. a kol.: Cytotoxicity and oncostatic activity of the thiazolidinedione derivative CGP 52608 on central nervous system cancer cells. *Cancer Lett.* **2004**, *211*, 47-55.
72. TARASCONI, P. a kol.: Synthesis, spectroscopic characterization and biological properties of new natural aldehydes thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 157-162.
73. HARTL, J., PALÁT, K.: *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Karolinum, Praha 1992, 238 s.
74. BERMUDEZ, L. E. a kol.: Thiosemicarbazole (thiacetazone-like) compound with activity against *Mycobacterium avium* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2685-2687.
75. BERMUDEZ, L. E. a kol.: SRI-286, a thiosemicarbazole, in combination with mefloquine and moxifloxacin for treatment of murine *Mycobacterium avium* complex disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3556-3558.
76. KUSHNER, S. a kol.: Experimental chemotherapy of tuberculosis II. Synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J. Am. Chem Soc.* **1952**, *74*, 3617-3621.
77. MILCZARSKA, B. a kol.: Studies on pyrazine derivatives. XXXII. Synthesis and tuberculostatic activity of acetylpyrazine thiosemicarbazone derivatives. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* **1998**, *55*, 289-295.
78. BUU-HOÏ, N. P. a kol.: Chalcones deriveés du thiofène et leurs thiosemicarbazones. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, 1646-1650.
79. MORRISON, N. E. a kol.: Antimycobacterial activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones in relation to their antileprosy activity. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **1981**, *49*, 180-186.
80. COLLINS, F. M. a kol.: Correlations between structure and antimycobacterial activity in a series of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *J. Gen. Microbiol.* **1982**, *128*, 1349-1356.
81. COLLINS, F. M. a kol.: Activity of 2-acetylpyridine and 2-acetylquinoline thiosemicarbazones tested in vitro in combination with other antituberculous drugs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1982**, *125*, 58-60.
82. DOBEK, A. S. a kol.: Thiosemicarbazones od 2-acetylpyridine, 2-acetylquinoline, 1- and 3-acetylisquinoline and related compounds as inhibitors of clinically significant bacteria in vitro. *Arzneim.-Forsch.* **1983**, *33*, 1583-1591.

83. SHEPARD, C. C. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones and Mycobacterium lepreae. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **1984**, *52*, 7-9.
84. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones XI: 2-(α -hydroxyacetyl)-pyridine thiosemicarbazones as antimalarial and antibacterial agents. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 1763-1767.
85. CHRISTENSON, B. a kol.: In vitro susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 570-573.
86. LI, C. Y. a kol.: Synthesis and bacteriostatic activity of thiosemicarbazones and their transition metal complexes. *Yao Xue Xue Bao* **1990**, *25*, 593-597; PubMed [databáze online]. NCBI, Bethesda (Maryland, USA), 2005. Dostupné z URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=pubmed>.
87. COCCO, M. T. a kol. Antimicrobial activity of some isothiosemicarbazones. *Farmaco* **1990**, *45*, 1101-1109.
88. CARDIA, M. C. a kol.: Synthesis and antimicrobial activity of novel arylideneisothiosemicarbazones. *Farmaco* **2000**, *55*, 93-98.
89. COCCO, M. T. a kol.: Synthesis and antimycobacterial activity of new S-alkylisothiosemicarbazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 501-506.
90. DE LOGU, A. a kol.: In vitro antimycobacterial activity of newly synthesized S-alkylisothiosemicarbazone derivatives and synergistic interactions in combination with rifamycins against Mycobacterium avium. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26*, 28-32.
91. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 1. A new class of potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 855-862.
92. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 2. N⁴,N⁴- Disubstituted derivatives as potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1367-1373.
93. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 3. Selenium analogs as potential anti-malarial agents. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* **1981**, *16*, 317-320.
94. SCOVILL, J. P. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 4. Complexes with transition metals as antimalarial and antileukemic agents. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1261-1264.
95. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 5. 1-[1-(2-Pyridyl)-ethyl]-3-thiosemicarbazides as potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 35-39.
96. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 7. Derivatives of 2-acetylquinoline as potential antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* **1984**, *19*, 49-53.
97. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 8. Derivatives of 1-acetylquinoline as potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 84-87.
98. SCOVILL, J. P. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 9. Derivatives of 2-acetylpyridine 1-oxide as potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 87-91.
99. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 10. 2-Propionyl-, 2-butyryl-, and 2-(2-methylpropionyl)pyridine thiosemicarbazones as potential antimalarial agents. *Arzneim.-Forsch.* **1984**, *34*, 1701-1703.

100. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 12. Derivatives of 3-acetylquinoline as potential antimalarial agents. *Arzneim.-Forsch.* **1986**, *36*, 10-13.
101. CASERO, R. A. a kol.: Activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones against *Trypanosoma rhodesiense* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, *18*, 317-322.
102. WALCOURT, A. a kol.: Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2004**, *36*, 401-407.
103. TENÓRIO, R. P. a kol.: Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2575-2578.
104. DU, X. a kol.: Synthesis and Structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695-2707.
105. CHIYANZU, I. a kol.: Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3527-3530.
106. GREENBAUM, D. C. a kol.: Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3212-3219.
107. AGUIRRE, G. a kol.: In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4885-4893.
108. FUJII, N. a kol.: Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 121-123.
109. CHIYANZU, I. a kol.: Design, synthesis and anti-plasmodial evaluation in vitro of new 4-aminoquinoline isatin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3249-3261.
110. SHAIENDRA, N. S. a kol.: Synthesis, characterisation and antiamebic activity of new thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives and their cyclooctadiene Ru(II) complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2675-2678.
111. BHARTI, N. a kol.: Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitro-thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3475-3478.
112. SHAIENDRA, N. S. a kol.: Synthesis, spectral studies and screening for antiamebicidal activity of new palladium(II) complexes derived from thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *131*, 689-692.
113. SINGH, S. a kol.: Synthesis, characterisation and in vitro antiamebic activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their palladium(II) and ruthenium(II) complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 459-465.
114. BHARTI, N. a kol.: Synthesis, characterisation and in vitro antiamebic activity of new palladium(II) complexes with 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde N⁴-substituted thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4679-4684.

115. ABID, M a kol.: Synthesis and antimicrobial activities of 1-N-substituted cyclised pyrazoline analogues of thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2213-2220.
116. LIBERTA, A. E. a kol.: Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. *Biometals* **1992**, *5*, 121-126.
117. SCOVILL, J. P. a kol.: Transition-metal complexes of 3-acetylisquinoline thiosemicarbazones as potential antifungal agents. *Transit. Met. Chem.* **1992**, *17*, 377-380.
118. WEST, D. X. a kol.: Spectral nature, antifungal activity and molecular structure of metal-complexes of acetylpyrazine N^4 -substituted thiosemicarbazones. *Transit. Met. Chem.* **1993**, *18*, 221-227.
119. OFFIONG, O. E. a kol.: Synthesis and biological activity of novel metal complexes of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Farmaco* **1995**, *50*, 625-632.
120. BERMEJO, E. a kol.: Preparation, structural characterization, and antifungal activities of complexes of group 12 metals with 2-acetylpyridine- and 2-acetylpyridine- N -oxide- N^4 -phenylthiosemicarbazones. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1999**, *625*, 961-968.
121. BERMEJO, E. a kol.: Synthesis, characterization and antifungal activities of complexes of group 12 metals with 2-acetylpyridine- N^4 -ethylthiosemicarbazone (H4EL) and 2-acetylpyridine- N -oxide- N^4 -phenylthiosemicarbazone (H4ELO). *Polyhedron* **1999**, *18*, 3695-3702.
122. KASUGA, N. C. a kol.: Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 4- and 6-coordinate nickel(II) complexes with three thiosemicarbazone and semicarbazone ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *84*, 55-65.
123. KOVALA-DEMERTZI, D. a kol.: Platinum(II) complexes with 2-acetylpyridine thiosemicarbazone –synthesis, crystal structure, spectral properties, and antimicrobial and antitumor activity. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *86*, 555-563.
124. KASUGA, N. C. a kol.: Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 298-310
125. REBOLLEDO, A. P. a kol.: Tin(IV) complexes of 2-benzoylpyridine N^4 -phenylthiosemicarbazone: spectral characterization, structural studies and antifungal activity. *Appl. Organomet. Chem.* **2003**, *17*, 945-951.
126. FOYE, W. O. a kol.: Synthesis and antimicrobial activities of N^4 -(2-acetoxymethoxymethyl)thiosemicarbazones and N^3 -(2-acetoxymethoxymethyl)thioureas. *J. Pharm Sci.* **1986**, *75*, 1180-1184.
127. CHOI, I. H. a kol.: Flexible docking of an acetoxyethoxymethyl derivative of thiosemicarbazone into free different species of dihydrofolate reductase. *Arch. Pharm. Res.* **2002**, *25*, 807-816.
128. MACCIONI, E. a kol.: An investigation of the biological effect of structural modifications of isothiosemicarbazones and their cyclic analogues. *Farmaco* **2003**, *58*, 951-959.
129. DE LOGU, A. a kol.: In vitro activity of 2-cyclohexylidenehydrazo-4-phenylthiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. And fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, 692-698.

130. YADAV, B. S. a kol.: Vibrational spectra, thermodynamic parameters and fungicidal activity of 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde thiosemicarbazone. *Indian J. Pure Appl. Biophys.* **1998**, *36*, 557-566
131. YADAV, B. S. a kol.: Thermodynamic parameters of antifungal 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde thiosemicarbazone. *Indian J. Pure Appl. Biophys.* **1999**, *37*, 34-41.
132. JOUAD, E. M. a kol.: Synthesis, structure and biological activity of nickel(II) complexes of 5-methyl-2-furfural thiosemicarbazone. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *86*, 565-571.
133. DEVI, V. K. R. a kol.: Synthesis, characterization and antimicrobial activity of embelinthiosemicarbazone and its transition metal complexes. *Asian J. Chem.* **2003**, *15*, 1380-1386; ISI Web of Knowledge [databáze online]. Thompson Corp., Philadelphia (Pennsylvania, USA), 2005. Dostupné z URL: <http://isi01.isiknowledge.com/portal.cgi/>.
134. IVANOV, V. E. a kol.: Antifungal and antibacterial activities of isatin thiosemicarbazones and their Cu(I) and Cu(II) complexes. *Khim-Farm. Zh.* 1989, *23*, 588-590; ISI Web of Knowledge [databáze online]. Thompson Corp., Philadelphia (Pennsylvania, USA), 2005. Dostupné z URL: <http://isi01.isiknowledge.com/portal.cgi/>.
135. CHOHAN, Z. H. a kol.: Isatin-derived antibacterial and antifungal compounds and their transition metal complexes. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2004**, *19*, 417-423.
136. RAMESHKUMAR, N. a kol.: Synthesis and biological activities of 2,6-diaryl-3-methyl-4-piperinone derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 188-193.
137. SOYKAN, C. a kol.: Synthesis, characterization, and biological activity of *N*-(4-acetylphenyl)-maleimide and its oxime, carbazone, thiosemicarbazone derivatives and their polymers. *J. Polymer Sci.* **2003**, *41*, 1942-1951.
138. EROL, I.: Synthesis, characterization, and biological activity of [2-oxo-2-(4-acetyl)phenyl-amino] ethylene methacrylate and its derivatives. *J. Polymer Sci.* **2004**, *42*, 3157-3169.
139. KLAYMAN, D. L. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones 13. Derivatives with antifilarial activity. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1422-1425.
140. SUBRAHMANYAM, D.: Antifilarials and their mode of action. *Ciba Found. Symp.* 1987, *127*, 246-264; PubMed [databáze online]. NCBI, Bethesda (Maryland, USA), 2005. Dostupné z URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=pubmed>.
141. KINNAMON, K. E. a kol.: A new class of anti-filariasis compounds – a preliminary look. *Mil. Med.* 1994, *159*, 368-372; ISI Web of Knowledge [databáze online]. Thompson Corp., Philadelphia (Pennsylvania, USA), 2005. Dostupné z URL: <http://isi01.isiknowledge.com/portal.cgi/>.
142. STROTE, G. a kol.: Chemotherapy for onchocerciasis: results of in vitro experiments with promising new compounds. *Trop. Med. Int. Health* **1998**, *3*, 397-407.
143. GURUPRASAD a kol.: Synthesis and biological activities of 3-hydroxy-5-(2',5'-disubstituted indol-3'-yl)-1,2,3-triazoles and 4-acetyl-2-acetylamino-5-(2',5'-disubstituted indol-3'-yl)-1,3,4-thiadiazolins. *Asian. J. Chem.* 2000, *12*, 39-44; ISI Web of Knowledge [databáze online]. Thompson Corp., Philadelphia (Pennsylvania, USA), 2005. Dostupné z URL:

<http://isi01.isiknowledge.com/portal.cgi/>.

144. KELLY, T. J. a kol.: Inhibition of ecdysis in *Oncopeltus fasciatus* by 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Pest. Biochem Physiol.* **1982**, 17, 35-41.
145. DE MILO A. B. a kol.: 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones as inhibitors of ecdysis in *Oncopeltus fasciatus* – structure activity relationship study. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 713-718.
146. SCHAFER, E. W. a kol.: Repelency and toxicity of 2-acetylpyridinethiosemicarbazones and related chemicals to wild birds. *J. Environ. Sci. Health Part A – Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **1986**, 21, 281-288.
147. LUKEVICS, E. a kol.: Neurotropic activity of aldehyde and ketone thiosemicarbazones with a heterocyclic component. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 983-988.
148. DIMMOCK, J. R. a kol.: Evaluation of some thiosemicarbazones of arylidene ketones and analogous for anticonvulsant activities. *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, 25, 581-588.
149. DIMMOCK, J. R. a kol.: Evaluation of the thiosemicarbazones of some aryl alkyl ketones and related compounds for anticonvulsant activities. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, 26, 529-534.
150. PANDEYA, S. N. a kol.: Recent evaluations of thiosemicarbazones and semicarbazones and related compounds for antineoplastic and anticonvulsant activities. *Pharmazie* **1993**, 48, 659-666.
151. DIMMOCK, J. R. a kol.: Evaluation of the semicarbazones, thiosemicarbazones and bis-carbohydrazones of some aryl alicyclic ketones for anticonvulsant and other biological properties. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 303-314.
152. PANDEYA, S. N. a kol.: Evaluation of semicarbazones for anticonvulsant and sedative-hypnotic properties. *Pharmazie* **1993**, 48, 300-302.
153. DIMMOCK, J. R. a kol.: Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 241-248.
154. DIMMOCK, J. R. a kol.: Anticonvulsants containing the *N*-(3-aryl-2-propenoyl)amido pharmacophore. *J. Enzym. Inh. Med. Chem.* **2004**, 19, 303-312.
155. KARALI, N. a kol.: Synthesis and anticonvulsant activity of some new thiosemicarbazone and 4-thiazolidone derivatives bearing an isatin moiety. *Farmaco* **1994**, 49, 819-822.
156. KARALI, N. a kol.: Synthesis, characterization and preliminary anticonvulsant evaluation of new indoline 2,3-dione derivatives. *Sci. Pharm.* **1997**, 65, 277-287.
157. YOGESHWARI, P. a kol.: Anticonvulsant and neurotoxicity evaluation of some 6-chloro-benzothiazolyl-2-thiosemicarbazones. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37, 231-236.
158. ELFEKY, S. A. H. a kol.: Synthesis and anticonvulsant properties of some novel quinazolinone thiosemicarbazone and 4-thiazolidone derivatives. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1991, 51, 61-66.
159. ELFEKY, S. A. H. a kol.: Synthesis and anticonvulsant properties of some novel quinazolinone thiosemicarbazone and 4-thiazolidone derivatives. *Arch. Pharm.* **1991**, 324, 381-383.

- 160.TAROUA, M. a kol.: New α , β and γ semicarbazone and thiosemicarbazone 1,3-dithiolanes as radioprotectors. Anticonvulsant activity. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 589-595.
- 161.KUMAMOTO, T. a kol.: Effect of 2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones and thiosemicarbazones on iodide uptake by the mouse thyroid: the relationship between their structure and anti-thyroid activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2595-2596.
- 162.HRNČIAROVÁ, M. a kol.: Inhibícia peroxidácie lipidov v erythrocytoch diabetických potkanov aminoguanidínom, resorcyliđenaminoguanidínom a ich kyslíkovými a sírnými analógmi. *Bratisl. Lek. Listy* **1998**, *99*, 364-397.
- 163.OMAR, A. M. M. E. a kol.: Steroidal derivatives Part 1: some novel steroidal thiosemicarbazones. Their synthesis, anticancer and endocrinological activities. *Pharmazie* **1978**, *33*, 577-580.
- 164.OPLETALOVÁ, V. a kol.: 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily jako meziproducty pro přípravu potenciálních léčiv. 56th Meeting of Chemical Societies, Ostrava, September 6 – 9, 2004. In: *Chem. Listy* **2004**, *98*, 669.
- 165.EASMON, J. a kol.: Pyridazines 47. The configuration of novel thiosemicarbazone derivatives of pyridazinecarbaldehydes and alkyl pyridazinyl ketones. *Heterocycles* **1989**, *29*, 1399-1408.
- 166.SILVA, M. J. a kol.: Synthesis and cytotoxic activity of *N*-substituted thiosemicarbazones of 3-(3,4-methylenedioxy)phenylpropanal. *Farmaco* **1998**, *53*, 241-243.
- 167.EASMON, J. a kol.: On the stereochemistry of novel biologically active diazine-derived thiosemicarbazones. *Sci. Pharm.* **1993**, *61*, 3-10.
- 168.OPLETALOVÁ, V. a kol.: Thiosemicarbazones of acetylpyrazines as potential drugs. Book of Abstracts of the 11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Brno, August 28 – September 1, 2005, PO-70.

5-ALKYLPYRAZIN-2-KARBONITRILY JAKO MEZIPRODUKTY PRO PŘÍPRAVU POTENCIÁLNÍCH LÉČIV

Veronika Opletalová^a, Marta Chlupáčová^a, Martina Posledníková^a,
Dana Zobalová^a, Jiří Kuneš^a a Viktor Voříšek^b

Univerzita Karlova v Praze

^a Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, opletalo@faf.cuni.cz, chlupacova@faf.cuni.cz

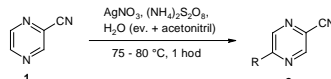
^b Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, vorisek@lfhk.cuni.cz

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů

Pyrazin-2-karbonitril (1, 0,1 mol) byl rozpuštěn ve vodě (300 ml) zahřáté na 80 °C. K tomuto roztoku byl přidán dusičnan stříbrný (0,01 mol) a příslušná kyselina (0,1 mol). Potom byl za míchání přikapán roztok peroxidisíranu amonného (0,11 mol) ve vodě (75 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě 75 - 80 °C po dobu jedné hodiny. Po vychladnutí byla zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného na pH 9 - 10 a kontinuálně extrahována etherem. Etherový výtěpek byl vysušen bezvodým síranem sodným.

Reakční schéma



2. Izolace z reakční směsi

- sloupcová chromatografie
- vakuová destilace

3. Identifikace produktů

- teplota varu
- IC, NMR, MS analýza

VÝSLEDKY A DISKUSE

V návaznosti na předchozí práci²⁰ byla homolytickou alkylací připravena nová řada 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů (2a-g, tab.). Jako zdroj alkylových radikálů byly použity tyto kyseliny: isomásečná, hexanová, heptanová, nonanová, oktanová, dekanová a fenylmásečná.

Prodlužující se řetězec kyseliny způsoboval problematické rozpouštění ve vodě, projevil se rovněž snížením výtěžku u jednotlivých reakcí. 5-nonylpyrazin-2-karbonitril (2f) se podařilo připravit pouze v acetonitrilu, u 5-heptylpyrazin-2-karbonitrilu (2d) byla reakce provedena jednou ve vodě a jednou ve směsi voda + acetonitril (1:1), rozpouštědlo na výtěžek ovšem vliv nemělo.

Všechny produkty byly identifikovány uvedenými metodami.

Tab. Alkylované pyrazin-2-karbonitrily

Látka	R	Výtěžek (%)	T. v.
2a	CH(CH ₃) ₂	63	100-102 °C/1,60 kPa
2b	n-C ₃ H ₇	56	118-125 °C/1,33 kPa
2c	n-C ₆ H ₁₃	44	125-127 °C/1,33 kPa
2d	n-C ₇ H ₁₅	30	135-140 °C/1,33 kPa
2e	n-C ₈ H ₁₇	12	115-120 °C/1,06 kPa
2f	n-C ₉ H ₁₉	17	127-130 °C/1,06 kPa
2g	CH ₂ C ₆ H ₅	54	91-93 °C/0,4 kPa

ZÁVĚR

Získané látky 2a-g slouží na našem pracovišti jako syntetické meziproducty pro přípravu alkylovaných acetylpyrazinů (reakce A ve schématu).

Acetylpyraziny slouží jako výchozí látka pro kondenzaci s thiosemikarbazidem (reakce B), s aromatickými aldehydy (reakce C) či s rhodaninem (reakce D) za účelem získání thiosemikarbazonů, derivátů chalkonu, resp. derivátů rhodaninu. Deriváty chalkonu poskytují dále adukty s thioley (reakce E).

Uvedené produkty jsou testovány jako potenciální antifungální a antimykobakteriální látky, pyrazinové analogy chalkonu (1-pyrazin-2-yl-3-fenylprop-2-en-1-ony) též jako inhibitory srážení krevních destiček.

ÚVOD

Substituované pyrazin-2-karbonitrily slouží jako meziproducty pro přípravu různých derivátů pyrazinu¹. Z nejvýznamnějších lze jmenovat substituované pyrazinkarboxylové kyseliny, pyrazinkarboxamidy, pyrazinkarbothioamidy, pyrazinaldosimy, pyrazinamidrazony^{2,3,4,5,6,7,8,9}. Sato¹⁰ studoval homolytickou acylaci substituovaných pyrazinkarbonitrilů.

Biokatalytická přeměna pyrazin-2-karbonitrilu na pyrazinamid¹¹ či pyrazinkarboxylovou kyselinu¹² byla pozorována u mikroorganismu *Rhodococcus rhodococcus* J1. Ze stejného substrátu lze za použití *Agrobacterium* sp. DSM 6336 získat 5-hydroxypyrazin-2-karboxylovou kyselinu¹³ jako další velmi výhodnou výchozí látku pro přípravu antituberkuloticky aktivních látek.

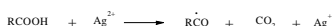
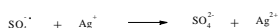
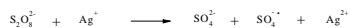
Pyrazinkarbonitrily s postranním dusíkatým řetězcem^{14,15,16,17} nebo substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily¹⁸ lze využít pro syntézu derivátů pteridinu. Tyto sloučeniny jsou testovány jako potenciální pesticidy¹⁹. Sloučeniny odvozené od pyrazin-2,3-dikarbonitrilu²⁰ jako např. chalkonové analogy²¹, azafalocyaniny^{22,23}, látky obsahující spiropyranovou skupinu²⁴ jsou velmi intenzivně studovány jako barviva.

SCA40 (6-brom-8-methylaminoimidazol[1,2-*a*]pyrazin-2-karbonitril je přednostně používán jako inhibitor PDE 3, vykazuje inhibiční aktivitu rovněž vůči PDE 4 a 5. Účinek této látky testovaný na lidském bronchu je srovnatelný s theofylinem (3mM)²⁵.

V rámci studia derivátů pyrazinu již byla na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty UK připravena jedna série 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů¹⁶. Produkty byly charakterizovány a použity pro přípravu odpovídajících 5-alkyl-2-acetylpyrazinů. Tyto látky byly testovány jako potenciální antiflogistika.

V současné době byla tato série rozšířena o řadu nových derivátů.

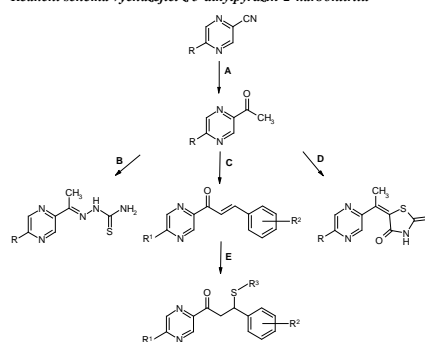
mechanismus homolytické alkylace²⁷



CÍL

příprava nové řady 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů

Reakční schéma vycházející z 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů



LITERATURA

1. Cheeseman, G. W. H., Wernick, E. S. G.: Recent Advances in Pyrazine Chemistry. In: Advances in Heterocyclic Chemistry, Vol.14, Katričky, A. R., Boulton, A. J. (Eds.), Academic Press, New York, London, 99-209 (1972).
2. Foks, H., Janowiec, M., Sienicka, J.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. 28, 295 (1976).
3. Foks, H., Janowiec, M.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. 29, 61 (1977).
4. Foks, H., Janowiec, M., Zieleniecki, M.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. 29, 663 (1977).
5. Foks, H., Janowiec, M., Manowska, W.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. 30, 113 (1978).
6. Foks, H., Janowiec, M.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. 36, 155 (1979).
7. Dlabal, K., Palát, K., Lyčka, A., Odlerová, Z.: Collect. Czech. Chem. Commun. 55, 2493 (1990).
8. Mikczarska, B., Foks, H., Janowiec, M., Zwolska-Kwiec, Z.: Acta Pol. Pharm. 49, 41 (1992).
9. Hartl, J., Doležal, M., Krinková, M., Lyčka, A., Odlerová, Z.: Collect. Czech. Chem. Commun. 67, 1109 (1996).
10. Sato, N., Kadota, H.: J. Heterocyclic Chem. 29, 1685 (1992).
11. Mauger, J., Nagasawa, T., Yamada, H.: J. Biotechnol. 8, 87 (1988).
12. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H.: J. Antibiot. (Tokyo) 43, 1316 (1990).
13. Wessert, M., Heinzmann, K., Kiener, A.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 48, 174 (1997).
14. Albert, A., Ota, K.: J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1, 22, 3727 (1971).
15. Werbel, D. F., Johnson, J., Eislager, E. F., Werbel, L. M.: J. Med. Chem. 21, 331 (1978).
16. Werbel, L. M., Johnson, J., Eislager, E. F., Worth, D. F.: J. Med. Chem. 21, 337 (1978).
17. Sato, N., Fukuya, S.: J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1, 89 (2000).
18. Jada, M., Wada, M.: J. Chem. Res. S, 648 (2003).
19. Shirai, K., Fukunishi, K., Yanagisawa, A., Takahashi, H., Matsuo, M.: J. Heterocyclic Chem. 37, 1151 (2000).
20. Nakamura, A., Ataka, T., Segawa, H., Takeuchi, Y., Takematsu, T.: Agric. Biol. Chem. 47, 1561 (1981).
21. Jaung, J. Y., Matsuo, M., Fukunishi, K.: Dyes and Pigments 40, 11 (1999).
22. Morkved, E. H., Kjosset, H., Osletten, H., Erchak, N.: J. Porphyrins and Phthalocyanines 3, 417 (1999).
23. Morkved, E. H., Osletten, H., Kjosset, H.: Acta Chem. Scand. 53, 1117 (1999).
24. Lee, B. H., Jaung, J. Y.: Dyes and Pigments 59, 135 (2003).
25. Cortijo, J., Pons, R., Dasi, E., Marín, N., Martínez-Losa, M., Advenier, C., Morcillo, E. J.: Naunyn-Schleiberg's Arch. Pharmacol. 356, 806 (1997).
26. Opletalová, V., Patel, A., Boulton, M., Dundrová, A., Lacinová, E., Pfevorová, M., Appeltauerová, M., Coufalová, M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 61, 1093 (1996).
27. Švandová, M.: Diplomová práce. Farm. Fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze (2001).

Práce byla řešena s podporou výzkumného záměru MSM 111600001.

THIOSEMICARBAZONES OF ACETILPYRAZINES AS POTENTIAL DRUGS

V. Opletalová^a, M. Pour^a, J. Kuneš^a, L.Silva^a, V. Buchta^a, J. Jampflek^b, D. R. Richardson^c, D. S. Kalinowski^c, M. Švandová^a, D. Zobalová^a

^aCharles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Veronika.Opletalova@faf.cuni.cz

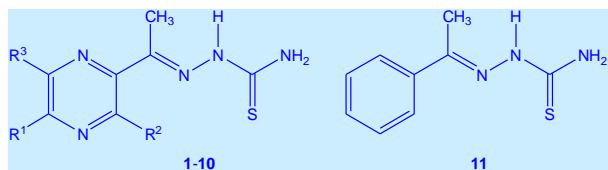
^bZentiva a.s., U kabelovny 130, CZ-102 37 Prague 10, Czech Republic

Josef.Jampflek@zentiva.cz

^cChildren's Cancer Institute Australia, PO Box 81, High St., Sydney, New South Wales 2031, Australia
drichardson@ccia.org.au

Thiosemicarbazones are relatively toxic compounds. In spite of their toxicity, some of them have been used as chemotherapeutic agents for life-threatening infections. Methisazone was investigated in the prophylaxis of smallpox [1] and thioacetazone is still being used as an anti-tuberculous drug [2]. Presently, thiosemicarbazones and their complexes with transition metals have been studied as potential antiviral, antibacterial, antimycobacterial, antiprotozoal, antifungal, and antineoplastic agents. Their anticonvulsant and neurotropic effects were reported as well [3].

Thiosemicarbazones **1-10** derived from acetylpyrazines were prepared in our laboratory within the research focused on biologically active derivatives of pyrazine. Acetophenone thiosemicarbazone **11** was prepared for comparison. Log *K* of the compound were determined by means of RP-HPLC and compared with log *P* values calculated using commercial software. The compounds were tested for various biological activities. The results of these studies are reported here.



CHEMISTRY

Starting 1-pyrazin-2-ylethan-1-one and 1-(5-alkylpyrazin-2-ylethan-1-ones) were prepared by the Grignard reaction from the corresponding pyrazine-2-carbonitriles [4, 5]. 5-Acetylpyrazine-2-carbonitrile was prepared by the biomolytic acetylation of pyrazine-2-carbonitrile [6]. The same procedure was then applied to 5-*tert*-butylpyrazine-2-carbonitrile to yield 3-acetyl-5-*tert*-butylpyrazine-2-carbonitrile. Dpignoc_da method was used to determine the relative positions of the substituents on the pyrazine ring [7]. Acetophenone (REACHM) was used for the preparation of thiosemicarbazone **11**. The title compounds were obtained by the condensation of the corresponding aryl methyl ketones with thiosemicarbazide (LACHEMA) in methanol with a few drops of acetic acid [8]. The products were then washed with water and crystallized from a suitable solvent. Analytical samples were dried over anhydrous phosphorus pentoxide under reduced pressure at room temperature. Melting points were determined on a Bötius apparatus and are uncorrected. The purity of the products was determined by RP-HPLC, and their identity corroborated by spectral data. Infrared spectra were recorded in KBr pellets on a Nicolet Impact 400 IR spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded for DMSO-*d*₆ solutions at ambient temperature on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C. Some characteristics are given in Table 1. In ¹H NMR spectra, signals of NH protons were in the range δ 10.22-10.71 ppm. This is indicative of *E*-configuration on the C=N double bond since *Z*-isomers have NH signals more downfield (δ = 15 ppm) [9]. Regarding the possible thio-thiol tautomerism, the absence of SH absorption bands at 2600-2500 cm⁻¹ in the IR spectra shows that the described thiosemicarbazones **1-11** exist in the C=S tautomeric form in the solid state (KBr pellets).

TABLE 1: Characteristics of thiosemicarbazones (TSC) 1-11

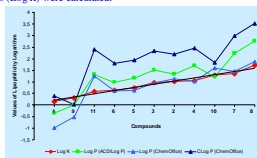
TSC	R ¹	R ²	R ³	Yield (%)	M. p. (°C) ^a	IR (ν, cm ⁻¹)	Purity (%)	Log <i>K</i>	Log <i>P</i> ACD	Log <i>P</i> ChemoDraw	CLog <i>P</i> ChemDraw
1	H	H	H	73	218-228 ^b ethanol (C=N)	1619	96.69	0.1437	-0.35 ± 0.61	-0.99	0.37975
2	<i>tert</i> -butyl	H	H	68	225-228 ethanol (C=N)	1609	98.05	1.0224	1.34 ± 0.61	1.14	2.20575
3	isobutyl	H	H	64	229-230 ethanol (C=N)	1613	97.14	0.9754	1.52 ± 0.61	0.95	2.33575
4	butyl	H	H	69	201-204 ethanol (C=N)	1612	97.48	1.0480	1.70 ± 0.61	1.04	2.46575
5	propyl	H	H	72	202-207 ethanol (C=N)	1613	96.58	0.7232	1.17 ± 0.61	0.62	1.93675
6	isopropyl	H	H	59	213-215 ethanol (C=N)	1606	99.01	0.6217	0.99 ± 0.61	0.60	1.08675
7	pentyl	H	H	64	189-190 ethanol (C=N)	1611	98.90	1.3562	2.24 ± 0.61	1.46	2.29475
8	hexyl	H	H	68	170-173 ethanol (C=N)	1603	99.05	1.7182	2.77 ± 0.61	1.87	3.52375
9	CN	H	H	76	238-242 acetone (C=N)	1598	95.92	0.3063	-0.01 ± 0.63	-0.53	0.0188925
10	H	CN	<i>tert</i> -butyl	75	158-160 ethanol (C=N)	1612	96.89	1.2999	1.23 ± 0.64	1.60	1.84489
11	-	-	-	65	115-117 ^c ethanol (C=N)	1589	98.95	0.5657	1.32 ± 0.58	1.26	2.401

^aall compounds melted under decomposition; ^bref. [8]; 225-226 °C; ^cref. [10]; 118-120 °C

RP-HPLC AND LIPOPHILICITY CALCULATIONS

The HPLC separation module Waters Alliance 2695 XE, Waters Photodiode Array Detector 2996 and the chromatographic column Symmetry[®] C₁₈ 5 μm, 4.6×250 mm, Part No. WAT054275, (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.) were used. Methanol + water 50 : 50 (v/v) was used as a mobile phase. The total flow of the column was 0.9 ml/min, injection 30 μl, column temperature 22 °C, sample temperature 10 °C. The detection was performed at 210 nm. The KI methanolic solution was used for the dead time (T₀) determination. The HPLC separation process was monitored by Millennium32[®] Chromatography Manager Software, Waters 2004 (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.). Retention times (T_R) were recorded, and capacity factors (K = (T_R-T₀)/T₀) their logarithms (Log *K*) were calculated.

ACD/Log *P*, ver. 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada) and ChemOffice Ultra, ver. 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.) were used to calculate hydrophobic parameters (Log *P* and CLog *P*) of the studied compounds. Log *P* is the logarithm of the partition coefficient for *n*-octanol/water. CLog *P* is the logarithm of *n*-octanol/water partition coefficient based on established chemical interactions. The results are shown in Table 1 and Figure 1. Experimentally determined Log *K* values correlate best with Log *P* values calculated by ChemOffice Ultra software.



ANTI-FUNGAL ACTIVITY

Anti-fungal susceptibility of all compounds was evaluated by the microdilution broth method [11] against *Candida albicans* ATCC 48489 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E 28 (CK), *Candida glabrata* 201 (CG), *Trichosporon beigeli* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Abisida corymbifera* 272 (AC) and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM). Minimum inhibitory concentration (MIC)

is defined as the concentration effecting 80% inhibition of fungal growth compared to control. Ketoconazole (batch no. E 3401, Janssen-Pharmaceutica) was used as a reference antifungal drug. The results are given in Table 2. 1-(5-Alkylpyrazin-2-yl)ethan-1-ones **2-8** were effective (MIC = 1-10 μmol/L) or at least moderately effective (MIC = > 10-100 μmol/L) against all tested strains. Non-substituted 1-pyrazin-2-yl)ethan-1-one **1** was less potent, whilst the thiosemicarbazones **9** and **10** bearing the cyano group on the pyrazine ring and acetophenone-thiosemicarbazone **11** were practically ineffective. The best antifungal properties were exhibited by the most lipophilic derivatives **7** and **8**. In some cases, the activity of these two compounds was comparable to that of ketoconazole.

TABLE 2: Anti-fungal activity of thiosemicarbazones (TSC) 1-11, (μmol/L)^a

TSC	CA	CT	CK	CG	TB	AF	AC	TM
	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	72h
1	62.5	500	125	62.5	125	125	250	31.25
2	15.63	62.5	15.63	15.63	31.25	31.25	31.25	15.63
3	15.63	62.5	31.25	15.63	31.25	62.5	62.5	15.63
4	15.63	62.5	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	15.63
5	15.63	62.5	31.25	31.25	31.25	31.25	62.5	15.63
6	7.81	7.81	31.25	7.81	31.25	15.63	62.5	31.25
7	15.63	15.63	62.5	15.63	31.25	62.5	125	31.25
8	3.91	3.91	3.91	3.91	7.81	15.63	15.63	7.81
9	125	> 250	250	125	250	> 250	> 250	62.5
10	125	> 250	250	250	250	> 250	> 250	62.5
11	> 500	> 500	62.5	250	500	> 500	> 500	250
	> 500	> 500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	250
ketoconazole	0.061	1.95	1.95	0.49	0.061	7.81	15.63	0.49
	0.122	3.91	3.91	1.95	0.122	7.81	31.25	1.95

ANTI-MYCObACTERIAL ACTIVITY

Primary screening of all compounds was conducted at 6.25 μg·ml⁻¹ (or molar equivalent of highest molecular weight compound in a series of congeners) against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) in the BACTEC 12B medium using a broth microdilution assay (Microplate Alamar Blue Assay, MABA) [12]. Compounds exhibiting fluorescence were tested in the BACTEC 460 radiometric system [12]. The compounds displaying at least 90% inhibition in the primary screen were re-evaluated at lower concentrations against *M. tuberculosis* H₃₇Rv to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) using MABA. The MIC is defined as the lowest concentration effecting the 90% reduction in fluorescence relative to controls. For the results see Table 3.

ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY

The effect of the studied compounds on cellular proliferation of the human neuroepitheloma cell line SK-N-MC were determined using the MTT [1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] assay. The details of the assay and the structures of the iron chelators that were used as positive controls can be found in ref. [13, 14]. The results (Table 3) show that the more hydrophobic analogues (**2, 3, 4, 7** and **8**) displayed highest anti-tumor effects.

TABLE 3: Anti-mycobacterial and anti-proliferative activity of thiosemicarbazones (TSC) 1-11

TSC	Inhibition of <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv		Anti-proliferative activity in SK-N-MC neuroepitheloma cell line
	% at 6.25 μg·ml ⁻¹	MIC (μg·ml ⁻¹)	IC (μmol·l ⁻¹)
1	non determined	non determined	> 6.25
2	95	6.25	0.18 ± 0.01
3	96	6.25	0.59 ± 0.13
4	98	0.39	0.26 ± 0.11
5	95	6.25	2.08 ± 1.40
6	non determined	non determined	2.90 ± 0.93
7	non determined	non determined	0.52 ± 0.22
8	non determined	non determined	0.18 ± 0.09
9	36	non determined	> 6.25
10	18	non determined	> 6.25
11	non determined	non determined	> 6.25
pyrazinamide	100	non determined	non determined
rifampicin	non determined	0.015-0.030	non determined
trifluoperazine	non determined	non determined	0.39 ± 0.01
desferrioxamine	non determined	non determined	5.97 ± 0.22
3H1	non determined	non determined	0.58 ± 0.02
Dp14mT	non determined	non determined	0.01 ± 0.01

[1] NEYTS, J. et al.: Therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections: historical background and perspectives. *Antiviral Res.* **2003**, *57*, 25-33. [2] JAWAHAR, M. S.: Current trends in chemotherapy of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* **2004**, *120*, 398-417. [3] BERALDO, H. et al.: The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 31-39. [4] OPLETALOVÁ, V. et al.: 5-Alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazine-carbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1093-1101. [5] ZOBALOVÁ, D.: Acetylpyrazines as intermediates for the synthesis of biologically active derivatives of pyrazine II. Diploma Thesis. Faculty of Pharmacy, Hradec Králové 2003. [6] OPLETALOVÁ, V. et al.: Homolytic acetylation of 2-pyrazinecarbonitrile. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **1999**, *XXIV*, 29-32. [7] ŠVANDOVÁ, M.: Acetylpyrazines as intermediates for the synthesis of biologically active derivatives of pyrazine II. Diploma Thesis. Faculty of Pharmacy, Hradec Králové 2001. [8] EASMON, J. et al.: Novel thiosemicarbazones derived from formyl- and acylhydrazines: synthesis, effects on cell proliferation, and synergism with antiviral agents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3288-3296. [9] EASMON, J. et al.: Pyridazines 47. The configuration of novel thiosemicarbazone derivatives of pyridazinecarbaldehydes and alkyl pyridazine ketones. *Heterocycles* **1989**, *29*, 1399-1408. [10] CrossFireBeistem [database online]. MDL, Information Systems, San Leandro (USA) 2005. Available on the URL: <http://www.mdll.com>. [11] OPLETALOVÁ, V. et al.: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photodynamic-inhibiting, antifungal and antimycobacterial Agents. *Farmacoo* **2002**, *57*, 135-144. [12] COLLINS, L. et al.: Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004-1009. [13] CHASTON, T. B. et al.: Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: Multiple cellular targets and the different mechanisms of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 402-414. [14] YUAN, J. et al.: Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* **2004**, *104*, 1450-1458.

The study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 0021620822) and by the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA 1A/8238-3). Antimycobacterial data were provided by the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition Coordinating Facility (TAACF) through a research and development contract with the U. S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.