

---

*Araştırma Makalesi / Research Article*

---

## **Ksantin Oksidaz İnhibitörü Yeni 1,2,3-Triazol Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Moleküler Doking Çalışmaları**

Ayşe TAN\*

*Muş Alparslan Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Muş  
(ORCID: 0000-0003-2692-7923)*

---

### **Öz**

Bu çalışmada, yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin (**4** ve **5**) sentezi, karakterizasyonu, ksantin oksidaz enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkilerinin incelenmesi ve moleküler doking çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle; hedef ürünler (**4** ve **5**), bütadien sülfondan çıkılarak çeşitli kimyasal transformasyonlarla sentezlendi. Sentezlenen bütün bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. İkinci aşamada; **4** ve **5** bileşiklerinin ksantin oksidaz enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri incelendi. Enzim inhibisyon sonuçlarına göre **4** ( $IC_{50} = 0.609 \mu M$ ) ve **5** ( $IC_{50} = 0.901 \mu M$ ) bileşiklerinin, ksantin oksidaz enzim inhibisyonu için ilaç olarak kullanılan allopurinolden ( $IC_{50} = 1.143 \mu M$ ) daha güçlü inhibisyon etki gösterdiği tespit edildi. Son olarak; **4** ve **5** bileşiklerinin, ksantin oksidaz eziminin (PDB ID:3NVY) aktif kısmına bağlanma modları, moleküler doking çalışmaları ile açıklandı.

**Anahtar kelimeler:** 1,2,3-triazol, Ksantin oksidaz, 1,3-dipolar siklokatılma, Moleküler doking.

---

## **The Synthesis, Characterization and Molecular Docking Studies of Novel 1,2,3-Triazole Derivatives as Xanthine Oxidase Inhibitor**

---

### **Abstract**

In this study, the synthesis, characterization of novel 1,2,3-triazole compounds (**4** and **5**), investigation of their *in vitro* inhibition effects on xanthine oxidase and molecular docking studies were carried out. For this purpose, firstly; the target products (**4** and **5**) were synthesized by various chemical transformations starting from butadiene sulfone. All of the synthesized compounds were characterized by spectroscopic methods. In the second step; *in vitro* inhibition effects of compounds **4** and **5** on xanthine oxidase were investigated. According to the enzyme inhibition results, It was determined that compounds **4** ( $IC_{50} = 0.609 \mu M$ ) and **5** ( $IC_{50} = 0.901 \mu M$ ) showed stronger inhibition effect than allopurinol ( $IC_{50} = 1.143 \mu M$ ), which is used as a drug for inhibition of xanthine oxidase. Finally, the binding modes of compounds **4** and **5** in the active part of xanthine oxidase (PDB ID:3NVY) were explained by molecular docking studies.

**Keywords:** 1,2,3-triazole, Xanthine oxidase, 1,3-dipolar cycloaddition, Molecular docking.

---

### **1. Giriş**

Orta çağda aşırı beslenme ve alkol alımı ile ilişkilendirilen ve halk arasında “kralların hastalığı” olarak adlandırılan gut hastalığı, eklemlerdeki ürik asitin kristalleşmesinden kaynaklanan bir tür enflamatuvaromatizmal hastalıktır [1]. Kristalleşen ürik asit eklemlerde, tendonlarda ve çevre dokularda birikir. Kristallerin eklemlerin içinde ve çevresinde birikmesi, geri dönüşü olmayan eklem hasarına yol açar, bu hasarın sebebi, serum urat konsantrasyonunun artmasıdır [1]. Hipoksantinine ksantine, ksantin ürik asite dönüşümünü, ksantin oksidaz (XO) enzimi gerçekleştirir [2, 3]. XO enzimi, gut hastalığında önemli bir rolü olan ürik asitin oluşumuna, dolayısıyla gut hastalığına sebep olmaktadır. Bu nedenle gut hastalığının tedavisinde XO enzim inhibisyonu hayati önem taşımaktadır.

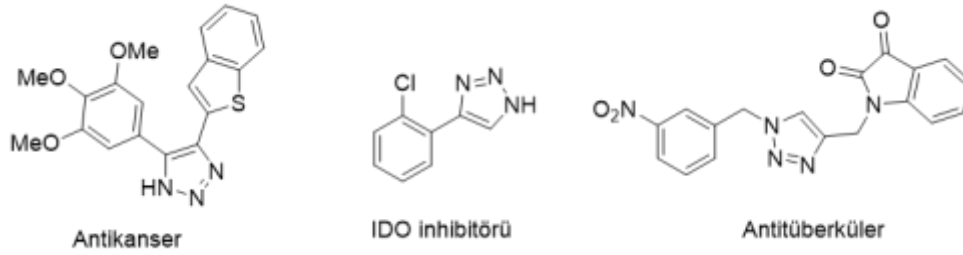
---

\*Sorumlu yazar: [a.tan@alparslan.edu.tr](mailto:a.tan@alparslan.edu.tr)

Geliş Tarihi: 08.11.2019, Kabul Tarihi: 20.03.2020

Yapısında pürin ihtiva eden allopurinol, uzun yıllardır kullanılan gut ilacıdır. Kronik gut hastalığında, kanda yüksek seviyede bulunan ürik asiti azaltmak için kullanılır [4]. Ağızdan alınan allopurinol, XO enzimini inhibe ederek, pürin metabolitlerinin ürik asite dönüşmesini engeller. Bir araştırmaya göre, allopurinol gibi pürin analogu ilaçların, anti metabolit aktivite sonucu nükleotitlere dönüştüğü rapor edilmiştir [5]. Ayrıca bu ilacın çok çeşitli ve ciddi yan etkilerinin olması kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, güçlü XO inhibe edici aktiviteye sahip ve pürin içermeyen alternatif ilaçların keşfine ihtiyaç vardır [6-9].

1,2,3-triazol ve sübtitüe türevleri çok çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı organik kimya, tıp kimyası özellikle ilaç keşfinde büyük bir öneme sahiptir [10]. 1,2,3-triazol yapısı içeren organik veya inorganik bir çok molekülün, antialerjik [11], antimikrobiyal [12], antibakteriyel [10], antitüberküler [10],  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörü [13], SGLT2 inhibitörü [14], IDO inhibitörü [15], asidik korozyon inhibitörü [16] gibi çok sayıda potansiyel biyolojik aktivite gösterdikleri birçok kaynakta bildirilmiştir. Bazı farmasotik aktif 1,2,3-triazol bileşiklerine Şekil 1 de örnek verilmiştir.



Şekil 1. Farmasotik aktif bazı 1,2,3-triazol bileşikleri

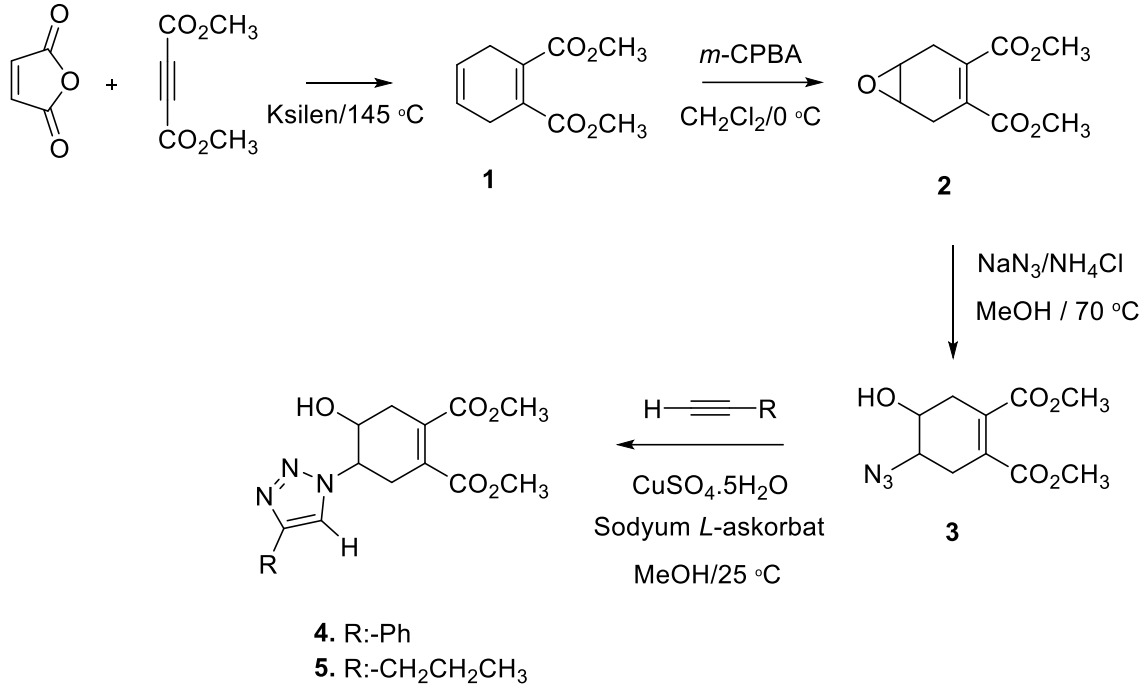
Yapılan bu çalışma kapsamında, 1,2,3-triazol yapısını içeren organik moleküllerin güçlü biyolojik özellik göstermeleri ve XO enzim inhibisyonu için duyulan etkili ilaç gereksiniminden yola çıkılarak, ılıman reaksiyon şartlarında, literatürde henüz bilinmeyen yeni 1,2,3-triazol bileşiklerinin (4 ve 5) sentezi, karakterizasyonu ve bu bileşiklerin XO inhibisyon etkisi incelendi. Ayrıca moleküler doking çalışması yapılarak 3D enzim-molekül etkileşimleri belirlendi.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. 4 ve 5 bileşiklerinin sentezi

1,2,3-triazol türevi olan 4 ve 5 bileşiklerinin sentezi için, öncelikle sentezi literatürde bilinen 1 [17] bileşiği, bütadien sülfon ile dimetil aseten dikarboksilatın ksilen ortamında, 145 °C'de 2 saat süren [4+2] siklokatalma reaksiyonu ile sentezlendi [17] (Şekil 2). 1 bileşiğinin *m*-CPBA[18] ile CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ortamında 0 °C'de 6 saat süren epoksidasyon reaksiyonu ile tek ürün olarak literatürde bilinen 2 [19, 20] bileşiği elde edildi (Şekil 2). Bir sonraki kademede, 2 bileşiğinin NaN<sub>3</sub> [21] ile NH<sub>4</sub>Cl varlığında, MeOH içerisinde 70 °C'de epoksit açılma reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 2). Bu reaksiyon ile 1,2,3-triazol sentezi için kilit rol oynayan, literatürde henüz bilinmeyen, hidroksi-azido yapısında yeni 3 bileşiği sentezlendi.

3 bileşiğinin daha sonra sırasıyla fenil aseten ve 1-pentin ile Cu(I) katalizörlüğünde 1,3-dipolar siklokatalma reaksiyonu [22, 23] gerçekleştirilerek literatürde olmayan, yeni 1,2,3-triazol türevi 4 ve 5 bileşikleri sentezlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Triazol türevlerinin (4 ve 5) sentez basamakları

## 2.2. Spektrel Analiz

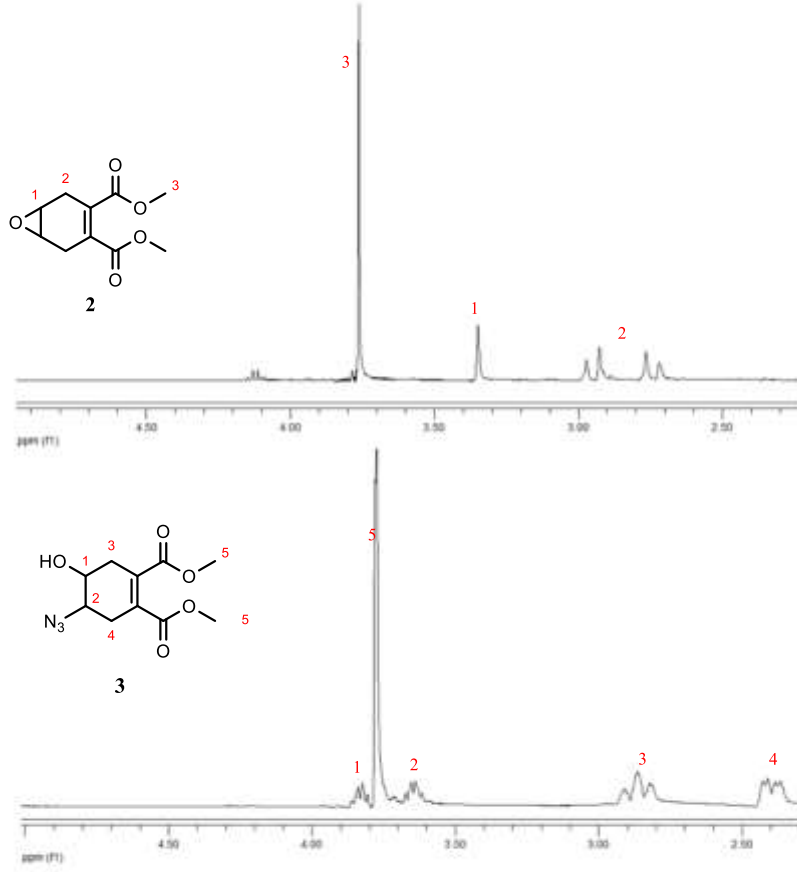
**2** bileşiğine ait <sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiğinde;  $\delta = 3.8$  (6H) ppm'deki kimyasal kayma değeri OCH<sub>3</sub> protonlarını,  $\delta = 3.4$  (2H) ppm'deki singlet sinyal epoksit grubunun bağlı olduğu -O-C-H\* protonlarının varlığını,  $\delta = 2.9$  (2H) ppm ve 2.7 (2H) ppm'deki kimyasal kayma değerleri ise siklohekzen halkasındaki CH<sub>2</sub> protonlarını göstermektedir (Şekil 3). Hidroksi-azido yapısındaki **3** bileşiğine ait IR spektrumunda;  $\nu = 3453.57$  cm<sup>-1</sup>'de gözlemlenen gerilme titreşimleri OH grubuna,  $\nu = 2103.57$  cm<sup>-1</sup>'de gözlemlenen gerilme titreşimleri ise karakteristik azido (-N<sub>3</sub>) N-N gerilme titreşimlerine aittir (Şekil 4). **3** bileşiğine ait <sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiğinde, **2** bileşiğinin  $\delta = 3.4$  ppm deki epoksitin -O-C-H\* protonlarına ait sinyalin,  $\delta = 3.8$  ppm (1H) ve 3.6 ppm'de (1H) iki multiplere ayrılması epoksit halkasının azit grubu ile açıldığı bir diğer göstergesidir,  $\delta = 2.8$  (2H) ppm ve 2.4 (2H) ppm'deki kimyasal kayma değerleri de siklohekzen halkasındaki CH<sub>2</sub> protonlarına aittir (Şekil 3).

Azit-alkin 1,3-dipolar siklokatalizasyonunun gerçekleştiği 1,2,3-triazol halkasındaki N-C=C-H protonuna ait singlet sinyal ile kolaylıkla belirlenebilmektedir. Bu sinyaller, **4** bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda fenil grubunun aromatik sinyalleri ile çakışırken, **5** bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda  $\delta = 7.3$  ppm'deki singlet sinyal net olarak görülmektedir. 1,2,3-triazol halkasındaki kuartern karbon atomunun (N-C\*=C-H) sinyalleri <sup>13</sup>C NMR spektrumunda **4** ve **5** bileşiği için sırasıyla  $\delta = 146.4$  ppm ve 147.2 ppm'de gözlemlenmiştir. **5** bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 5); siklohekzen halkasındaki HO-C-H\* ve N-C-H protonları sırasıyla  $\delta = 4.5$  (1H) ppm ve 4.4 (1H) ppm'de ester grubuna ait OCH<sub>3</sub> protonları  $\delta = 3.8$  (3H) ppm, 3.7 (3H) ppm'de sinyal verirken, triazol halkasına bağlı CH<sub>2</sub> protonları ile siklohekzen halkasındaki CH<sub>2</sub> protonları çakışık halde  $\delta = 3.1$  (3H) ppm ve 2.5 (3H) ppm'de sinyal vermiştir.

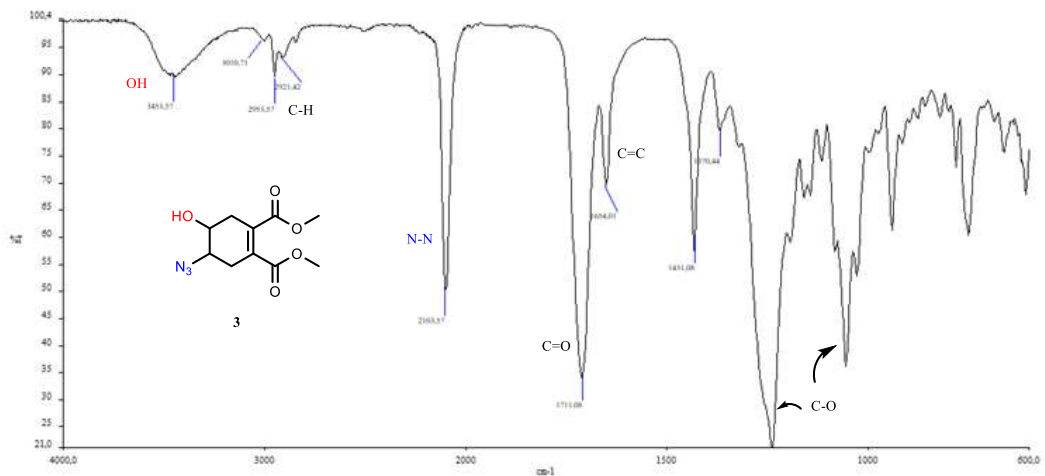
**5** bileşiğine ait OH grubu sinyalleri, IR spektrumunda  $\nu = 3275.00$  cm<sup>-1</sup>'deki gerilme titreşimleri ile karakterize edildi. Yine triazol halkasına bağlı diğer alkil protonları sırasıyla  $\delta = 1.6$  (2H, CH<sub>2</sub>) ppm, 0.9 (3H, CH<sub>3</sub>) ppm'deki sinyaller ile karakterize edildi. **4** bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda fenil grubuna ait sinyaller  $\delta = 7.7 - 7.3$  (5H) ppm arasında gözlemlenirken, diğer protonlar **5** bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu ile benzer sinyaller vermiştir.

**5** bileşiğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 5);  $\delta = 167.5$  ppm ve 166.8 ppm'deki sinyaller karbonil karbonuna (C=O),  $\delta = 134.5$  ppm ve 131.1 ppm'deki sinyaller siklohekzen halkasındaki çift bağ karbonlarına (C=C),  $\delta = 121.8$  ppm deki sinyal triazol halkasındaki N-C-H

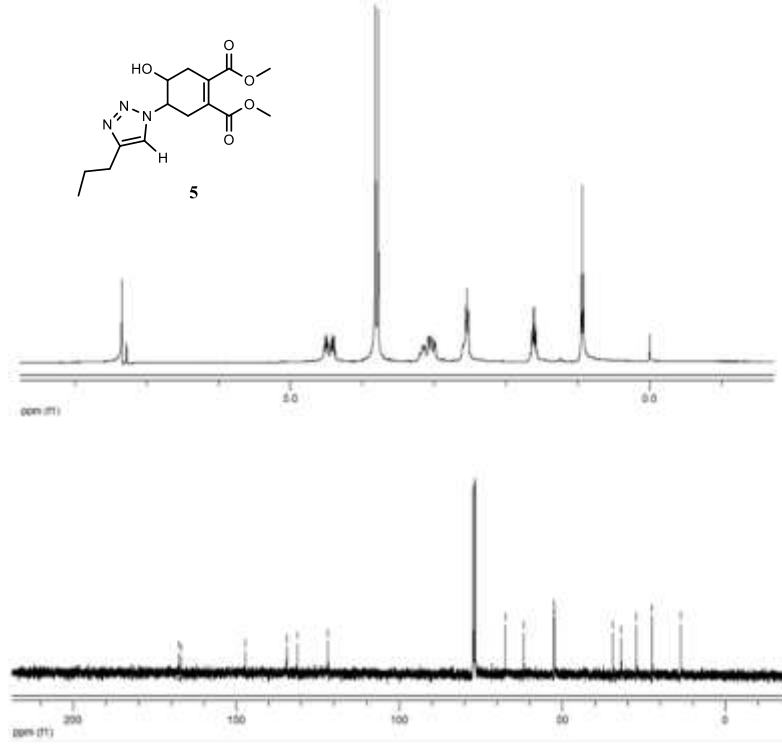
karbonuna,  $\delta = 67.5$  ppm'deki sinyal siklohekzen halkasındaki C-OH, ve  $\delta = 61.8$  ppm'de ve C-N-N karbonuna aitken, sırasıyla  $\delta = 34.5$  ppm ve  $31.9$  ppm'deki sinyaller siklohekzen halkasındaki CH<sub>2</sub> karbonlarına,  $\delta = 52.56$  ppm ve  $52.52$  ppm'deki sinyaller ester grubundaki metil karbonlarına (OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 27.4$  (CH<sub>2</sub>) ppm,  $22.4$  (CH<sub>2</sub>) ppm,  $13.8$  (CH<sub>3</sub>) ppm'deki sinyaller triazol halkasına bağlı alkil zincirinin karbonlarına aittir. **4** bileşiğine ait <sup>13</sup>C NMR spektrumu incelendiğinde, aromatik sinyaller hariç diğer sinyaller **5** bileşiğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu ile benzerdir.



Şekil 3. **2** ve **3** bileşiklerinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz)



Şekil 4. **3** bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 5. 5 bileşiğine ait  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (100 MHz)

### 2.3.4 ve 5 bileşiklerinin Ksantin Oksidaz (XO) Enzimi Üzerine *İn Vitro* İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

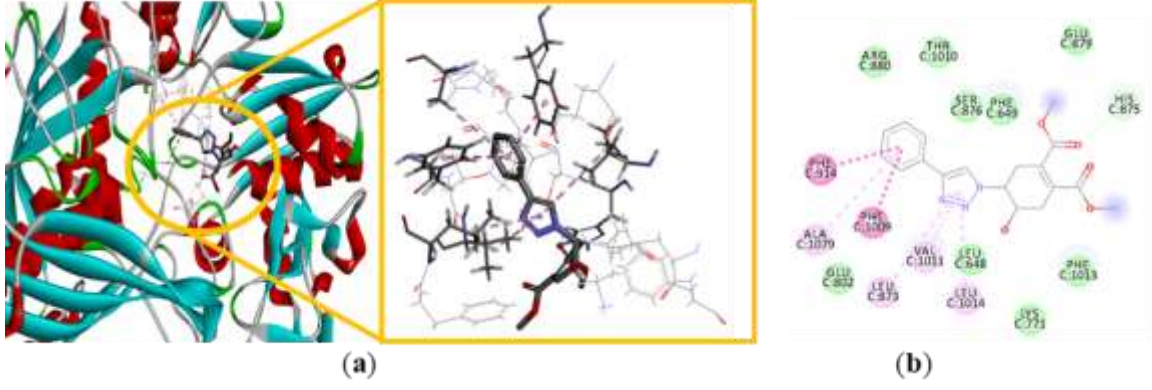
4 ve 5 bileşiklerinin Ksantin Oksidaz enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon deneyi, XO inhibisyonu için ilaç olarak kullanılan allopurinol ile kıyaslanarak gerçekleştirildi. 4, 5 ve allopurinol için  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı (Tablo 1). Sonuçlara göre inhibisyon aktiviteleri  $4 > 5 >$  allopurinol sırasında değişmektedir.

Tablo 1. Ksantin oksidaz enzim inhibisyonunun  $\text{IC}_{50}$  değerleri.

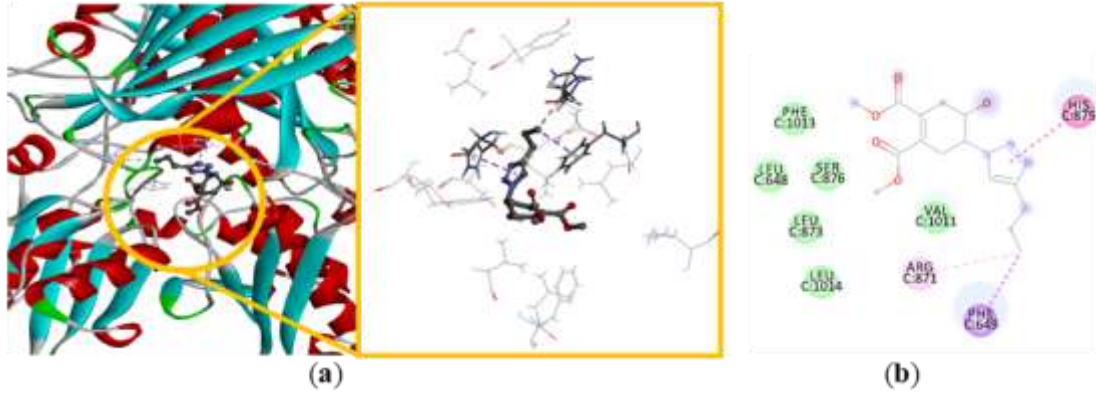
Bileşik	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{R}^2$
4	$0.609 \pm 0.006$	0.987
5	$0.901 \pm 0.031$	0.976
Allopurinol	$1.143 \pm 0.019$	0.989

### 2.4. Moleküler Doking

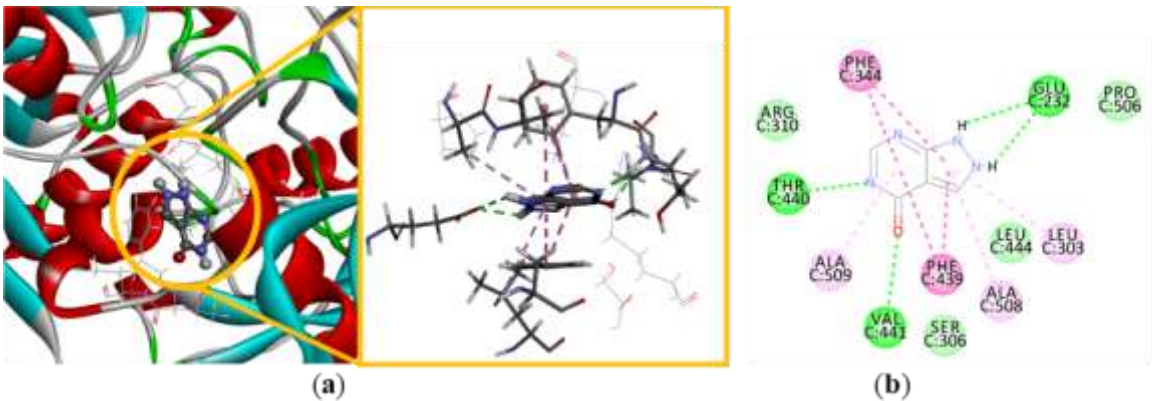
Allopurinol, 4 ve 5 bileşiklerinin deneysel enzim inhibisyon sonuçlarını teorik olarak desteklemek üzere moleküler doking çalışması gerçekleştirildi. Reseptör proteinin C zinciri üzerinde yapılan doking çalışmalarına göre; 4 ve 5 bileşiklerinin proteinin aktif kısmı ile H-bağı yapmadığı, hidrofobik etkileşim yaptığı görüldü (Tablo 2). Allopurinolün, 4 ve 5 bileşiklerinin aksine GLU232, THR440, VAL441 ile konvansiyonel H-bağı, PHE344, PHE439 ile yoğun pi-pi etkileşimi ve ALA509, ALA508, LEU303 ile pi-alkil etkileşimi, ARG310, SER306, LEU444, PRO506 ile van der Waals etkileşimi yaptığı görüldü (Şekil 8)[24]. 4 bileşiğinin, ARG880, THR1010, SER876, PHE649, GLU879, GLU802, LEU648, LYS771, PHE1013 ile van der Waals etkileşimi, HIS875 ile C-H bağı, PHE914, PHE1009 ile yoğun pi-pi etkileşimi, ALA1079, VAL1011, LEU1014, LEU873 ile zayıf pi-pi etkileşimi yaptığı görüldü (Şekil 6). 5 bileşiğinin, HIS875 ile yoğun pi-pi etkileşimi, PHE649 ile pi-sigma etkileşimi, ARG871 ile alkil etkileşimi, PHE1013, LEU648, SER876, LEU873, VAL1011, LEU1014 ile van der Waals etkileşimleri yaptığı görüldü (Şekil 7).



**Şekil 6.** 4 bileşiğinin Ksantin oksidaz (PDB ID:3NVY) ile **a)** bağlanma modu ve reseptör-ligand etkileşimi 3D gösterimi (4 bileşiği top-çubuk görünümde, proteinin etkileşim yaptığı kısımlar ise çizgi ve çubuk gösterimi ile belirtilmiştir), **b)** reseptör-ligand etkileşiminin 2D gösterimi

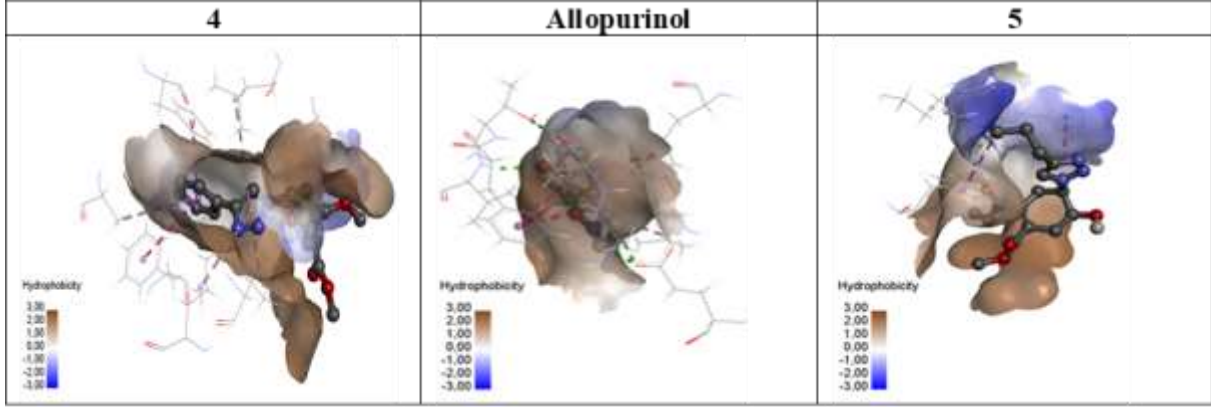


**Şekil 7.** 5 bileşiğinin Ksantin Oksidaz (PDB ID:3NVY) ile **a)** bağlanma modu ve reseptör-ligand etkileşimi 3D gösterimi (5 bileşiği top-çubuk görünümde, proteinin etkileşim yaptığı kısımlar ise çizgi ve çubuk gösterimi ile belirtilmiştir), **b)** reseptör-ligand etkileşimi 2D gösterimi



**Şekil 8.** Allopurinol bileşiğinin Ksantin Oksidaz (PDB ID:3NVY) ile **a)** bağlanma modu ve reseptör-ligand etkileşimi 3D gösterimi (Allopurinol bileşiği top-çubuk görünümde, proteinin etkileşim yaptığı kısımlar ise çizgi ve çubuk gösterimi ile belirtilmiştir), **b)** reseptör-ligand etkileşimi 2D gösterimi



**Tablo 2. 4, 5 ve allopurinol bileşiklerinin Ksantin Oksidaz enzimi aktif kısmı ile yaptığı hidrofobik etkileşim**

### 3. Bulgular

#### 3.1. Sentez

Bütün reaktif ve soventler Sigma-Aldrich'ten satın alınmış ve saflaştırma işlemi uygulanmamıştır. <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları Bruker 400 MHz spektrofotometresi ile alındı. IR spektrumları Perkin Elmer Spektrometresi ile ATR başlık kullanılarak alındı, 4000-600 cm<sup>-1</sup> arası esas alındı. Erime noktası tayini için Thermo Scientific Melting Point cihazı kullanıldı. Kütle spektrumları Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS ile alındı.

#### *Dimetil siklohekza-1,4-dien-1,2-dikarboksilat (1)*

Bütadien sülfon (0.5 g, 4.23 mmol) 5 ml ksilen içerisinde çözüldü ve karışıma dimetil asetlen di karboksilat (1.2 g, 8.46 mmol) ilave edilerek ortamın sıcaklığı 145 °C'ye getirildi. Reaksiyon ince tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi, 2 saat sonra durduruldu. Çözücüsü düşük basınçta uzaklaştırıldı. Ham ürün kolon kromatografisi ile % 5 EtOAc/*n*-Hekzan çözücü sisteminde saflaştırıldı. **1** bileşiği % 50 (0.41 g, 2.09 mmol) verimle viskoz, renksiz sıvı olarak elde edildi [17].

#### *Dimetil 7-oksabisiklo[4.1.0]hept-3-en-3,4-dikarboksilat (2)*

**1** bileşiği 0 °C'de (0.5 g, 2.54 mmol) 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içerisinde çözüldü. Reaksiyon ortamına *m*-CPBA (0.5 g, 3.05 mmol) ilave edildi. 0 °C'de başlayan reaksiyon, oda sıcaklığında devam ettirildi. Reaksiyon İTK ile takip edildi, 6 saat sonra durduruldu. Karışım, önce %10'luk 10 mL NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi ile nötralize edildi, ardından 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ve 3x10 mL su ilave edilerek ekstrakte edildi. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutulup, çözücüsü düşük basınçta uzaklaştırıldı. Ham ürün kolon kromatografisi ile %15 EtOAc/*n*-Hekzan çözücü sisteminde saflaştırıldı. **2** bileşiği %80 (0.42 g, 2 mmol) verimle viskoz, açık sarı, sıvı olarak elde edildi. <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.8 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.4 (s, 2H), 2.9 (d, AB sisteminin A kısmı, *J* = 17.6 Hz, 2H), 2.7 (d, AB sisteminin B kısmı, *J* = 19.2 Hz, 2H), <sup>13</sup>C NMR (δ, ppm, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):167.9, 130.2, 52.3, 49.8, 26.5

#### *Dimetil 4-azido-5-hidroksisikloheks-1-en-1,2-dikarboksilat (3)*

**2** bileşiği (0.5 g, 2.35 mmol) 20 mL MeOH içerisinde çözüldü, karışıma (0.45 g, 7.05 mmol) NaN<sub>3</sub> ve NH<sub>4</sub>Cl (0.37 g, 7.05) ilave edildi. Reaksiyon sıcaklığı 70 °C'ye getirildi. Reaksiyon İTK ile takip edildi ve 24 saat sonra durduruldu. Çözücüsü düşük basınçta uzaklaştırıldı. Karışım, 20 mL EtOAc ve 3x10 mL su ilave edilerek ekstrakte edildi. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutulup, ham ürün kolon kromatografisi ile %10 EtOAc/*n*-Hekzan çözücü sisteminde saflaştırıldı. **3** bileşiği %80 (0.48 g, 1.88 mmol) verimle viskoz, açık sarı sıvı olarak elde edildi. <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.8 (m, 1H), 3.7 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.6 (m, 1H), 2.8 (td, *J* = 4, 8 Hz, AB sisteminin A kısmı, 2H), 2.4 (ddd, *J* = 4, 8, 21.2 Hz, AB sisteminin B kısmı, 2H), <sup>13</sup>C NMR (δ, ppm, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 167.7, 167.1, 133.5,

131.2, 68.2, 60.9, 52.5, 33.2, 30.2, IR (cm<sup>-1</sup>): 3453.57, 3010.71, 2953.57, 2921.42, 2103.57, 1711.08, 1654.01, 1431.08, 1370.44, HR-ESI-MS: 256.09138 [M+H]<sup>+</sup>, hesaplanan:256.09335 [M+H]<sup>+</sup>

#### **Dimetil 4-hidroksi-5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)sikloheks-1-en-1,2-dikarboksilat (4)**

**3** bileşiği (0.44 g, 1.72 mmol) 10 mL MeOH içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında, karışıma sırasıyla, 5 mL suda çözülmüş sodyum L-askorbat (0.034 g, 0.172 mmol) ve 5 mL suda çözülmüş CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0.042 g, 0.172 mmol) ilave edildi. Homojen karışıma fenil asetilen (0.19 mL, 1.72 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon İTK ile takip edildi ve 24 saat sonra durduruldu. Karışım, 10 mL EtOAc ilave edilerek ekstrakte edildi. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutuldu. Ham ürün kolon kromatografisi ile % 50 EtOAc/*n*-Hekzan çözücü sisteminde saflaştırıldı. **4** bileşiği %90 (0.55 g, 1.55 mmol) verimle, mat beyaz renkli, katı kristal olarak elde edildi. E.N: 159 °C, <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.7 (s, 1H), 7.5 (m, 2H), 7.3 (m, 3H), 4.5 (m, 1H), 4.4. (s, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.29 (m, 1H), 3.09 (m, 2H), 2.6 (m, 1H), <sup>13</sup>C NMR (δ, ppm, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):167.6, 166.8, 146.4, 134.6, 131.1, 29.4, 128.6, 128.04, 125.1, 121.2, 67.8, 62.6, 52.5, 52.5, 34.6, 31.4, IR (cm<sup>-1</sup>): 3432.14, 3128.57, 3014.28, 2953.57, 2903.57, 1720.00, 1657.57, 1486.36, 1461.40, 1427.51, HR-ESI-MS: 358.14222 [M+H]<sup>+</sup>, hesaplanan: 358.14030 [M+H]<sup>+</sup>

#### **Dimetil 4-hidroksi-5-(4-propil-1H-1,2,3-triazol-1-il)sikloheks-1-en-1,2-dikarboksilat (5)**

**3** bileşiği (0.44, 1.72 mmol) 10 mL MeOH içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında, karışıma sırasıyla, 5 mL suda çözülmüş sodyum L-askorbat (0.034 g, 0.172 mmol) ve 5 mL suda çözülmüş CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0.042 g, 0.172 mmol) ilave edildi. Homojen karışıma 1-pentin (0.17 mL, 1.72 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında, İTK ile takip edildi ve 24 saat sonra durduruldu. Karışım, 10 mL EtOAc ilave edilerek ekstrakte edildi. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutuldu. Ham ürün kolon kromatografisi ile % 50 EtOAc/*n*-Hekzan çözücü sisteminde saflaştırıldı. **5** bileşiği % 95 (0.53 g, 1.63 mmol) verimle, parlak sarı renkli, katı kristal olarak elde edildi. E.N: 118 °C, <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.3 (s, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.7 (s, 3H), 3.1 (m, 3H), 2.5 (m, 3H), 1.6 (p, J = 7.6 Hz, 2H), 0.9 (t, J = 7.6 Hz, 3H), <sup>13</sup>C NMR (δ, ppm, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 167.5, 166.8, 147.2, 134.5, 131.1, 121.8, 67.5, 61.8, 52.56, 52.52, 34.5, 31.9, 27.4, 22.4, 13.8, IR (cm<sup>-1</sup>): 3275.00, 2964.28, 2928.57, 2875.00, 1725.35, 1709.29, 1646.87, 1547.00, 1434.64, HR-ESI-MS: 324.15707 [M+H]<sup>+</sup>, hesaplanan: 324.15595 [M+H]<sup>+</sup>

### **3.2. 4 ve 5 bileşiklerinin Ksantin Oksidaz (XO) inhibisyon etkilerinin *in vitro* ölçümü**

*In vitro* XO inhibisyon analiz metodu, Sweeney ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [25]. Enzim aktivitesi, ürik asit oluşumunun, 37 °C'de, 294 nm'de Shimadzu UV-1601 spektrofotometre ile ölçülmesiyle test edildi. XO inhibisyonunun IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması için reaksiyon karışımına farklı konsantrasyonlarda allopurinol, **4** ve **5** bileşikleri eklendi. Kısaca, enzim tahlil protokolü; fosfat tamponu (50 mM, pH = 7.4), XO (0.2 U) ve ksantin (1 mM) içerir. Enzim, test edilen bileşiklerle (10 dakika) önceden inkübe edildi, daha sonra reaksiyon karışımına ksantin ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Test edilen bileşikler DMSO içinde çözüldü, sonra fosfat tamponu ile seyreltildi, reaksiyon karışımındaki son DMSO konsantrasyonu, (% 0.01 h / h)'den daha düşüktü ve bu oran, enzim tahlili ile etkileşime girmez [26]. Tüm deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirildi ve değerler üç deney sonucu olarak ifade edildi. Allopurinol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Tüm bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri, XO inhibisyonunun, inhibitör yokluğunda ürün oluşumuna kıyasla, ürik asit oluşumundaki azalma açısından incelenerek ölçüldü. XO aktivitesinin IC<sub>50</sub> inhibisyon yüzdesi aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

A = Test bileşiği olmadan 294 nm'de alınan absorbans değeri,

B = Test bileşiği ile 294 nm'de alınan absorbans değeri.



### 3.3. Moleküler doking Çalışması

Moleküler doking analizleri, hedef protein ile bir inhibitör molekül arasındaki etkileşimi keşfetmek için kullanılan en uygun yaklaşımdır [27-30]. Doking çalışmaları UCSF Chimera (1.13.1) programı ile gerçekleştirildi. Protein 3D kristalografik yapısı Protein Data Bank'tan (www.rcsb.org), (PDB ID:3NVY) indirildi [31]. Bileşiklerin (4, 5 ve allopurinol) 2D yapıları ChemDraw Ultra 12.0 ile çizildi. Avogadro software [32] ile 2D çizimleri optimize edildi. Bağlanma için proteinin su ve diğer kalıntıları UCSF Chimera (1.13.1) ile silindi [33]. UCSF Chimera (1.13.1) araçlarından Dock Prep ile polar hidrojenler ve Gasteiger yükleri eklendi. Autodock Vina [34] ile Grid kutusu hazırlandı. Grid kutusu merkez değerleri X:36 Å, Y:22 Å, Z:18 Å (hacim: 20 Å<sup>3</sup>) olarak belirlendi. UCSF Chimera doking sonuçları, Discovery Studio Visualizer [35] ile görüntüldü.

### 4.Sonuç

Uzun yıllardır XO enzim inhibisyonu için kullanılan etkin ilaç allopurinoldür. Ancak, allopurinolün yapısal olarak pürin ihtiva etmesi ve ciddi yan etkilerinin [5] olması bu ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle allopurinole alternatif, pürin içermeyen yeni ilaçların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu çalışma ile allopurinolden daha aktif ve pürin içermeyen yeni 1,2,3-triazol (4 ve 5) bileşikleri sentetizlendi. Yapılan moleküler doking çalışmaları ile ksantin oksidaz enziminin aktif kısmı ile 4, 5 ve allopurinol bileşiklerinin bağlanma modları belirlendi. Bu etkileşimlere göre; 4 ve 5 bileşikleri yapısal olarak incelendiğinde aromatik grupların bağlanmada daha etkili olduğu görüldü.

### Teşekkür

Çalışmalarında desteğini esirgemeyen Sayın Samir Abbas Ali Noma'ya, değerli hocalarım Prof. Dr. Burhan ATEŞ ve Prof. Dr. Yunus KARA'ya, aynı zamanda Atatürk Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

### Yazarların Katkısı

Bu makale tek isimli bir çalışma olup, tüm katkı yazara aittir.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır

### Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada, araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur. Araştırma etik kurul izni gerektirmemektedir.

### Kaynaklar

- [1] Mehta S.K., Nayeem N. 2014. Natural xanthine oxidase inhibitors for management of gout: a review. Research and reviews: journal of medical and health sciences, 3: 4-13.
- [2] Borges F., Fernandes E., Roleira F. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. Current medicinal chemistry, 9: 195-217.
- [3] Kıbrız İ.E., Saçmacı M., Yıldırım İ., Abbas Ali Noma S., Taşkın T.T., Ateş B. 2018. Xanthine oxidase inhibitory activity of new pyrrole carboxamide derivatives: In vitro and in silico studies. Archiv der pharmazie, 351 (10): 1800165.
- [4] Pacher P., Nivorozhkin A., Szabo C. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacological reviews, 58: 87-114.
- [5] Baldwin J., Kasinger P., Novello F., Sprague J., Duggan D. 1975. 4-trifluoromethylimidazoles and 5-(4-pyridyl)-1, 2, 4-triazoles, new classes of xanthine oxidase inhibitors. Journal of medicinal chemistry, 18: 895-900.

- [6] Wang S., Yan J., Wang J., Chen J., Zhang T., Zhao Y., Xue M. 2010. Synthesis of some 5-phenylisoxazole-3-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 45: 2663-2670.
- [7] Ishibuchi S., Morimoto H., Oe T., Ikebe T., Inoue H., Fukunari A., Kamezawa M., Yamada I., Naka Y. 2001. Synthesis and structure–activity relationships of 1-phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11: 879-882.
- [8] Shukla S., Kumar D., Ojha R., Gupta M.K., Nepali K., Bedi P.M. 2014. 4, 6-diaryl/heteroarylpyrimidin-2 (1h)-ones as a new class of xanthine oxidase inhibitors. *Archiv der pharmazie*, 347: 486-495.
- [9] Song J.U., Choi S.P., Kim T.H., Jung C.-K., Lee J.-Y., Jung S.-H., Kim G.T. 2015. Design and synthesis of novel 2-(indol-5-yl) thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25: 1254-1258.
- [10] Phatak P.S., Bakale R.D., Dhumal S.T., Dahiwade L.K., Choudhari P.B., Krishna V.S., Sriram D., Haval K.P. 2019. Synthesis, antitubercular evaluation and molecular docking studies of phthalimide bearing 1,2,3-triazoles. *Synthetic communications*, 49: 2017-2028.
- [11] Rajasekar S., Anbarasan P. 2019. A general proline catalyzed synthesis of 4, 5-disubstituted n-sulfonyl-1, 2, 3-triazoles from 1, 3-dicarbonyl compounds and sulfonyl azide. *Chemistry-an asian journal*, <https://doi.org/10.1002/asia.201901015>.
- [12] Kushwaha K., Kaushik N., Jain S.C. 2014. Design and synthesis of novel 2H-chromen-2-one derivatives bearing 1, 2, 3-triazole moiety as lead antimicrobials. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24: 1795-1801.
- [13] Wang G., Peng Z., Wang J., Li J., Li X. 2016. Synthesis and biological evaluation of novel 2, 4, 5-triarylimidazole–1, 2, 3-triazole derivatives via click chemistry as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26: 5719-5723.
- [14] Li L.-T., Zhou L.-F., Li Y.-J., Huang J., Liu R.-H., Wang B., Wang P. 2012. Facile synthesis of 1, 2, 3-triazole analogs of SGLT2 inhibitors by ‘click chemistry’. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22: 642-644.
- [15] Röhrig U.F., Majjigapu S.R., Grosdidier A.I., Bron S., Stroobant V., Pilotte L., Colau D., Vogel P., Van den Eynde B.J., Zoete V. 2012. Rational design of 4-aryl-1, 2, 3-triazoles for indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 inhibition. *Journal of medicinal chemistry*, 55: 5270-5290.
- [16] González-Olvera R., Espinoza-Vázquez A., Negrón-Silva G., Palomar-Pardavé M., Romero-Romo M., Santillan R. 2013. Multicomponent click synthesis of new 1, 2, 3-triazole derivatives of pyrimidine nucleobases: Promising acidic corrosion inhibitors for steel. *Molecules*, 18: 15064-15079.
- [17] DiFrancesco D., Pinhas A.R. 1986. The nickel-promoted 1, 3-migration of an sp<sup>2</sup> center; ring expansion of a vinylcyclobutene. *The Journal of organic chemistry*, 51: 2098-2102.
- [18] Kuhn T., Tamm C., Riesen A., Zehnder M. 1989. Stereoselective hydrolysis of the dimethyl 4, 5-epoxy-1, 2-cis-cyclohexanedicarboxylates with pig liver esterase (PLE). *Tetrahedron letters*, 30: 693-696.
- [19] Hudlicky T., Fan R., Reed J.W., Gadamasetti K.G. 1992. Divinylcyclopropane-cycloheptadiene rearrangement. *Org. React.*, (Hoboken, NJ, U. S.) 41: No pp. given.
- [20] Voskresenskii V.A., Shakirzyanova S.S., Byl'ev V.A. 1962. Some regularities in the plasticizing of poly(vinyl chloride) with oxides of tetrahydrophthalates. *Izv. vyssh. uchebn. zaved., khim. khim. tekhnol.*, 5: 322-325.
- [21] Acquaaah-Harrison, G. 2010. Antibacterial agents: 1, 4-disubstituted 1, 2, 3-triazole analogs of the oxazolidinone. Doctor of philosophy, The faculty of the college of arts and sciences of Ohio University.
- [22] Himo F., Lovell T., Hilgraf R., Rostovtsev V.V., Noodleman L., Sharpless K.B., Fokin V.V. 2005. Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the american chemical society*, 127: 210-216.
- [23] Worrell B.T., Malik J.A., Fokin V.V. 2013. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*, 340: 457-460.
- [24] Tan A. 2020. Novel 1, 2, 3-triazole compounds: Synthesis, In vitro xanthine oxidase inhibitory activity, and molecular docking studies. *J. Mol. Struct.*, 128060.

- [25] Sweeney A.P., Wyllie S.G., Shalliker R.A., Markham J. 2001. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of ethnopharmacology*, 75 (2-3): 273-277.
- [26] Nile S.H., Kumar B., Park S.W. 2013. In vitro evaluation of selected benzimidazole derivatives as an antioxidant and xanthine oxidase inhibitors. *Chemical biology & drug design.*, 82: 290-295.
- [27] Hassan M., Ashraf Z., Abbas Q., Raza H., Seo S.-Y. 2018. Exploration of novel human tyrosinase inhibitors by molecular modeling, docking and simulation studies. *Interdisciplinary sciences: computational life sciences*, 10: 68-80.
- [28] Hassan M., Abbas Q., Ashraf Z.A. Moustafa A., Seo S.-Y. 2017. Pharmacoinformatics exploration of polyphenol oxidases leading to novel inhibitors by virtual screening and molecular dynamic simulation study. *Computational biology and chemistry*, 68: 131-142.
- [29] Langham J. 2014. Ranking small molecules by how much they preferentially inhibit the growth of cancer cell lines with either BRAF or KRAS oncogene mutations. *Peer J PrePrints*, 2: e532v1.
- [30] Maroli N., Kolandaivel P., 2019. Comparative study of stability and transport of molecules through cyclic peptide nanotube and aquaporin: A molecular dynamics simulation approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-14.
- [31] Berman H., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T., Weissig H., Shindyalov I., Bourne P. 2000. The protein data Bank nucleic acids research, 28: 235-242. URL: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) Citation.
- [32] Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4 (1): 17.
- [33] Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25 (13): 1605-1612.
- [34] Trott O., Olson A.J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31: 455-461.
- [35] Biovia D.S. 2017. Discovery studio visualizer, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. to be found under <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php> (accessed: 12.12.2017).