

В.О. Астахіна¹, М.В. Воевудський¹, С.І. Коваленко², О.З. Комаровська-Порохнявець³, В.П. Новіков³,
О.В. Крищик¹, О.В. Харченко¹

ЕТИЛОВИЙ ЕСТЕР 4-МЕРКАПТО-6,8-ДИМЕТИЛ-1-ОКСО-1,2-ДИГІДРОПІРОЛО[1,2-D][1,2,4]-ТРИАЗИН-7-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ: ФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

¹ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», м. Дніпропетровськ,

²Запорізький державний медичний університет,

³Національний університет «Львівська політехніка»

Ключові слова: етиловий естер, окисні реакції, функціоналізація, біологічна активність.

Ключевые слова: этиловый эстер, окислительные реакции, функционализация, биологическая активность.

Key words: ethyl ester, oxidation reactions, functionalization, biological activity.

Вивчено реакції алкілювання, лужного гідролізу, амінолізу та гідразінолізу етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти. Досліджено антиоксидантну, антирадикальну, протимікробну і протигрибкову активності синтезованих сполук у дослідах *in vitro*. Виявлено «сполуку-лідера», рекомендовану для подальших досліджень у ряді модельних патологій, у механізмі розвитку яких провідна роль належить окисним реакціям.

Изучены реакции алкилирования, щелочного гидролиза, аминолитиза и гидразинолитиза этилового эфира 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигидропирроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти. Исследованы антиоксидантная, антирадикальная, противомикробная и противогрибковая активности синтезированных веществ в опытах *in vitro*. Обнаружено «вещество-лидер», рекомендованное для дальнейших исследований на ряде модельных патологий, в механизме развития которых ведущая роль принадлежит окислительным реакциям.

The reactions of alkylation, alkaline hydrolysis, aminolysis and hydrazinolysis of ethyl ether 4-mercapto-6,8-dimethyl-1-oxo-1,2-dihydro-pyrrolo [1,2-d] [1,2,4]-triazin-7- carboxylic acid were studied. Investigation of the antioxidant, antiradical and antimicrobial activities of the synthesized compounds *in vitro* gave an opportunity to reveal the most promising derivative (4b), that was recommended for further biological research on the model pathologies with oxydative reactions.

Встановлено, що реакція етилового естеру 5-гідразінокарбоніл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти з етилксантогенатом калію проходить селективно з утворенням етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти з високим виходом [1]. Високий фармакологічний потенціал α -анельованих піролів (антимікробна, антиоксидантна, протиракова та ін. види біологічної активності [2,3]), а також наявність реакційоздатної тіольної групи зумовлює актуальність подальшого дослідження можливих шляхів модифікації даної біциклічної системи, а також допомагає у вирішенні однієї з першочергових проблем фармакології – виявлення залежності «структура – активність».

МЕТА РОБОТИ

Дослідження реакційної здатності етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти в реакціях алкілювання, лужного гідролізу, амінолізу, гідразінолізу та вивчення біологічної активності отриманих похідних *in vitro* з метою виявлення найбільш перспективного серед них.

Реакцію алкілювання тіолу (1) проводили у водно-спиртовому середовищі за наявності еквімолярної кількості гідроксиду натрію або калію (схема 1). У якості алкілюючих агентів використано галоїдні алкіли, монохлороцтова кислота, а також цілий ряд монохлорацетамідів.

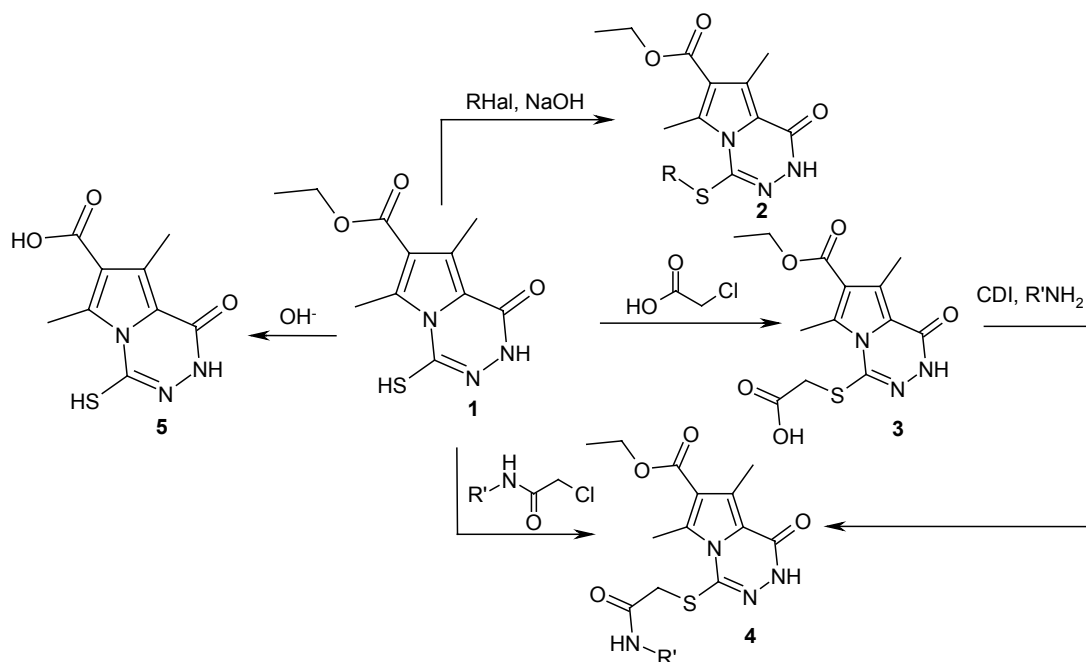
У випадку тіопохідних (4), отриманих прямим алкілюванням монохлорацетамідами, проведено зустрічний синтез у 2 стадії: алкілювання монохлороцтовою кислотою на першій стадії та

наступне амідування з використанням карбодімідазолу (CDI), як активатора карбоксильної групи (схема 1). Вихід кінцевих продуктів у випадку одностадійного методу вищий і в середньому складав від 65 до 90%.

Будова синтезованих речовин (2), (3) і (4) підтверджена даними елементного аналізу (табл. 1) та ¹H ЯМР-спектроскопії (табл. 2).

У ¹H ЯМР-спектрах сполук (2), (4) наявний синглет синглету NH протону триазінонового циклу в області 12,18–12,23 м.ч., а у випадку сполуки 4m зазначений сигнал спостерігається у слабшому полі (12,32 м.ч.) за рахунок акцепторного впливу замісника. Сигнали протонів естерної групи: триплет 3 протонів знаходиться в області 1,24–1,27 м.ч. і кватрет 2 протонів – в області 4,15–4,18 м.ч., сигнали 2 метильних груп, поєднаних з пірольним циклом, – в області 2,36–2,44 і 2,4–2,46 м.ч. Окрім цих, у спектрах сполук (4) резонують сингали синглету амідного протону в області 8,77–10,87 м.ч. і синглет 2 протонів CH₂ в області 4,21–4,5 м.ч. У спектрах також наявні відповідні сигнали замісників (табл. 2).

Лужний гідроліз проводили при двогодинному кип'ятінні тіолу (1) в надлишку 20% водного розчину гідроксиду натрію. Встановлено, що в зазначених умовах піролотриазінонова система стабільна, й гідроліз проходить за естерною групою с утворенням відповідної карбонової кислоти (5, схема 1), ¹H ЯМР-спектр якої характеризується інтенсивним синглетом протонів 2 метильних груп при 2,38 м.д. та синглетами NH- і SH-протону триазінонового циклу в області 12,02 м.д. і 12,2 м.д. відповідно (табл. 2).



R= C₂H₅, CH₂=CHCH₂, CH₂C₆H₄-4-Br, CH₂(CO)OC₂H₅, CH(COOC₂H₅)COCH₃
 R'= C₆H₅, CH₂C₆H₅, 2-CH₃C₆H₅, 3-CH₃C₆H₅, 4-CH₃C₆H₅, 2,4-CH₃C₆H₅, 2-CH₃-4-OHC₆H₅, 2-OCH₃C₆H₅, 4-OCH₃C₆H₅, 2-NO₂-4-OCH₃C₆H₅, 4-BrC₆H₅, 2-IC₆H₅, нафтил-1, 4-амидопірино, піридил-2, морфоліл-1, піперидил-1, діетиламіно

У випадку проведення реакції амінолізу під дією морфоліну та гідразінолізу 64% гідразингідратом виявлено певні особливості. Так, і в першому, і в другому випадку при кімнатній температурі в спиртовому середовищі реакція проходить з утворенням індивідуальних продуктів, аналіз ¹H ЯМР-спектрів яких дав можливість характеризувати їх як тіюлати (6,7) (схема 2). Зазначені продукти реакції легко розчинні у воді, а при підкисленні водних розчинів утворюється вихідний тіол (1). Слід зазначити, що час реакції і співвідношення реагентів не впливали на напрямок реакції. Вірогідно, цей факт можна пояснити підвищеною кислотністю тіольної групи у даній гетероциклічній системі.

З метою заміни тіо- на гідразино- групу, при неможливості прямого гідразінолізу тіолу (1), проведено гідразіноліз алкілпохідного (схема 2). Встановлено, що S-етилпохідне (2a) в умовах тривалого кип'ятіння в спиртовому розчині гідразингідрату проходить неселективно з утворенням 4-гідразино-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]триазин-7-карбогідразиду (8), структуру якого доведено за допомогою ПМР-спектроскопії. Так, у ¹H ЯМР-спектрі гідразиду (8), по-перше, відсутній набір сигналів протонів етоксикарбонільної групи; по-друге, з'являються характерні протони гідразиногрупи положення 4 (3,5 м.д. уш. с. (2H, NH₂NH), 8,5 м.д. с. (1H, NH₂NH)), а також гідразидного залишку (4,2 м.д. уш. с. (2H, NH₂NHCO), 8,6 м.д. с. (1H, NH₂NHCO)). Крім того, зберігається інтенсивний синглет протонів 2 метильних груп 2,38 м.д., сингал синглету NH протону триазинонового циклу в області 12,18–12,23 м.ч.

Для синтезованих S-алкілпохідних етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти (2b) та (4a-f, h-j, l-r) проведено

біологічні дослідження з визначення їх антиоксидантної, антибактеріальної та протигрибкової активностей.

Результати проведених досліджень на антиоксидантну активність (AOA) показали, що всі сполуки на моделі неферментативного ініціювання вільнорадикального окислення (BPO) *in vitro* перевищували за активністю препарат порівняння «Тіотриазолін» (табл. 3). Слід відзначити, що, на відміну від (2b), антиоксидантні властивості піролотриазинонів (4a-f, h-j, l-r) при концентрації 10⁻⁵ М вищі, ніж при 10⁻³ М. Ступінь прояву властивостей визначається замісниками у 3 положенні триазинонового циклу. Аналіз впливу природи радикалу на AOA піролотриазинонів (4) вказує на те, що введення о- та п-метильного замісника в бензольне кільце підвищує їх антиоксидантні властивості відносно незаміщеного похідного (4a). Метокси- і метильна група в третьому положенні бензольного кільця, зменшують AOA властивості S-алкіл похідних (4). Тоді як сполуки (4o) та (4r) у концентрації 10⁻⁵ М за силою дії майже вдвічі перевершують тіотриазолін. Наявність атому галогену в фенільному заміснику також підвищує антиоксидантні властивості сполуки (4l).

Дослідження антирадикальної активності (ARA) на моделі інгібування супероксидрадикалу показало, що дія речовин в концентрації 10⁻³ М близька до еталону порівняння тіотриазоліну. Дія речовин у концентрації 10⁻⁵ М значно перевищувала дію тіотриазоліну. Необхідно відзначити, що залежність ARA від природи радикалу така ж, як і у випадку визначення AOA на моделі неферментативного ініціювання BPO *in vitro*.

При моделюванні спонтанної окисної модифікації білка (ОМБ) показано, що у гомогенаті відмічається зниження рівня продуктів BPO (табл. 4). Так, рівень АФГ і КФГ

Фізико-хімічні властивості синтезованих сполук

№ сп.	R	T _{пл.} , °C	Вихід, %	Знайдено, N (%)	Емпірична формула	Вирахувано, N (%)
1	H	260–262	52	15,75	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	15,73
2a	C ₂ H ₅	115–117	59	14,25	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	14,24
2b	CH ₂ =CHCH ₂	97–98	53	13,44	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	13,42
2c	CH ₂ C ₆ H ₄ -4-Br	195–196	60	9,64	C ₁₈ H ₁₈ BrN ₃ O ₃	9,63
2d	CH ₂ COOC ₂ H ₅	150–152	59	11,87	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	11,89
2e	CH(COOC ₂ H ₅)COCH ₃	144–145	47	10,65	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₆ S	10,63
3	CH ₂ COOH	125–126	67	12,91	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₅ S	12,92
4a	C ₆ H ₅	218–220	13,4	14,01	C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₄ S	14
4b	CH ₂ C ₆ H ₅	198–200	25,6	11,65	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	11,66
4c	2-CH ₃ C ₆ H ₅	230–232	25	11,66	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	11,66
4d	3-CH ₃ C ₆ H ₅	210–213	16,4	11,66	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	11,66
4e	4-CH ₃ C ₆ H ₅	221–222	20,6	11,65	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	11,66
4f	2,4-CH ₃ C ₆ H ₅	217–218	25,0	11,32	C ₂₁ H ₂₄ N ₄ O ₄ S	11,33
4g	2-CH ₃ -4-НОС ₆ H ₅	234–236	15,5	11,3	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₅ S	11,28
4h	2-CH ₃ OC ₆ H ₅	178–180	28,1	11,29	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₅ S	11,28
4i	4-CH ₃ OC ₆ H ₅	223–225	12,5	11,28	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₅ S	11,28
4j	2-NO ₂ -4-CH ₃ OC ₆ H ₅	175–177	26,6	12,92	C ₂₀ H ₂₁ N ₅ O ₇ S	12,93
4k	4-BrC ₆ H ₅	222–223	25,1	11,68	C ₁₉ H ₁₉ BrN ₄ O ₄ S	11,69
4l	2-IC ₆ H ₅	135–136	17,5	10,68	C ₁₉ H ₁₉ IN ₄ O ₄ S	10,65
4m	нафтіл-1	241–242	33,1	12,45	C ₂₃ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	12,43
4n	4-амідопірино	224–226	13	16,91	C ₂₄ H ₂₆ N ₆ O ₅ S	16,9
4o	піридил-2	220–222	13,2	14,12	C ₁₈ H ₁₉ N ₅ O ₄ S	14,14
4p	морфоліл-1	100–102	12,8	14,20	C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₅ S	14,21
4q	піперидил-1	272–274	16,2	14,29	C ₁₈ H ₂₄ N ₄ O ₄ S	14,29
4r	диетиламіно	170–172	15,4	14,76	C ₁₇ H ₂₄ N ₄ O ₄ S	14,74
5	–	305–306 розкл.	84	17,57	C ₉ H ₉ N ₃ O ₃ S	17,57
6	–	229–230	95	23,4	C ₁₁ H ₁₇ N ₅ O ₃ S	23,41
7	–	160–162	93	11,84	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	11,86
8	–	249–251	63	30,92	C ₉ H ₁₃ N ₇ O ₂ S	30,9

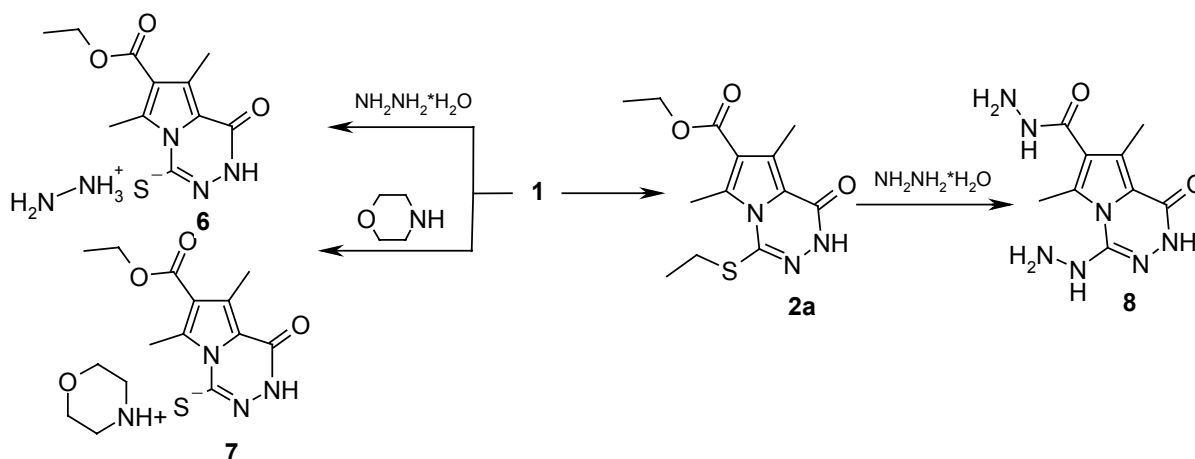
– основних маркерів деструкції білкових молекул, що кількісно реагують з 2,4-динітрофенілгіdraзином (2,4-ДНФГ), – був у 9 ($\lambda=274$ нм) і 4 ($\lambda=363$ нм) разів вищим за інтактне значення. Введення синтезованих сполук до гомогенату мозку щурів в умовах ОМБ призводить в абсолютній більшості випадків до зниження рівня АФГ і КФГ. Так, на зниження рівня маркерів ВРО впливають усі досліджувані сполуки. Однак дія багатьох з них у концентрації 10^{-3} М нижча за дію тіотриазоліну. Зниження концентрації всіх речовин позитивно впливає на результат. Найбільше пригнічують утворення АФГ і КФГ S-алкіл похідні (**4b**) та (**4e**). Вони перевищують за силою дії еталонну речовину майже на 25%. Слід відзначити, що, на відміну від амідів (**4**), алкілпохідне (**2b**) пригнічує утворення АФГ і КФГ, незалежно від досліджуваної концентрації, значно перевищуючи за силою дії тіотриазолін.

Отже, синтезовані сполуки проявляють АОА та АРА на

моделях ініціювання ВРО *in vitro*, а також знижують рівень АФГ і КФГ при ініціюванні спонтанної ОМБ, перевищуючи силу дії препарату порівняння або конкуруючи з ним.

Результати проведеного мікробіологічного скринінгу дифузії в агар показали, що більшість синтезованих сполук не пригнічують ріст мікроорганізмів (табл. 5). Тільки похідні амідів (**4d**, **4m**, **4n**, **4p**) пригнічують діаметр зон росту мікроорганізмів щодо *S. aureus*, *Muc. luteum*, *C. tenuis* і *A. niger*, поступаючись при цьому еталонам порівняння ванкоміцину та ністатину в досліджуваних концентраціях (табл. 5).

При використанні методу серійних розведень виявлено бактеріостатичні показники для сполуки (**4d**) щодо грамнегативної культури бактерій *E. coli* – 500 мкг/мл (табл. 6). Тоді як ріст культури грам-позитивної бактерії *St. aureus* пригнічує сполука (**4n**) в концентрації 125 мкг/мл, а для сполуки (**2b**) МБсК і МБцК становить 62,5 мкг/мл і 125 мкг/мл відповідно. Найбільш ефективні протигрибкові



показники встановлено для сполук (2b), (4b), (4e), (4i), (4m), що в концентраціях 3,9–31,5 мкг/мл проявляють фунгістатичні й фунгіцидні властивості відносно дріжджового гриба *Candida tenuis*, а речовини (4d) і (4n) мають помірну фунгістатичну активність (500 мкг/мл) щодо культур грибів *Candida tenuis*. Фунгістатичні властивості відносно гриба *Aspergillus niger* проявляють сполука (2b) (125 мкг/мл), (4d) і (4n) (500 мкг/мл).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ХІМІЧНА ЧАСТИНА

4-*R*-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]-тріазин-7-карбонова кислота (2a-e). 0,00749 моль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]-тріазин-7-карбонової кислоти (1) розчиняють у 20 мл 1,5% розчину NaOH ізопропілового спирту при нагріванні. Після повного розчинення краплями додають 0,00749 моль відповідного галогеналкілу та кип'яють протягом 30 хвилин. Після закінчення реакції спирт видаляють з реакційної суміші у вакуумі водострумного насосу. Залишок кілька разів промивають водою, після чого перекристалізують із суміші ізопропіловий спирт-вода (1:1).

{7-(Етоксикарбоніл)-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]тріазин-4-іл}тіо}оцтова кислота (3). 0,00749 моль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]-тріазин-7-карбонової кислоти (1) розчиняють в 20 мл 1,5% розчину NaOH в ізопропілового спирті. Після повного розчинення краплями додають 0,00749 моль монохлороцтової кислоти та кип'яють протягом 30 хвилин. Після закінчення реакції спирт видаляють з реакційної суміші у вакуумі водострумного насосу. Залишок розчиняють у 20 мл води, фільтрують, підкислюють хлористоводневою кислотою до pH 3–4, утворений осад відфільтровують.

Етиловий естер 6,8-диметил-4-{2-(*R*-аміно)-2-оксоетил}тіо}-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]тріазин-7-карбонової кислоти (4a-r).

Метод А. 0,00749 моль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло [1,2-*d*] [1,2,4]-тріазин-7-карбонової кислоти (1) розчиняють в

20 мл 1,5 % розчину NaOH в ізопропілового спирті. Після повного розчинення краплями додають 0,00749 моль відповідного монохлорацетиламідів та кип'яють протягом 30 хвилин. Після закінчення реакції спирт відганяють з реакційної суміші у вакуумі водострумного насосу. Залишок відфільтровують і кілька разів промивають водою, після чого перекристалізують із суміші ізопропіловий спирт-вода (1:1).

Метод Б. До розчину 0,05 моль {[7-(етоксикарбоніл)-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]тріазин-4-іл}тіо}оцтової кислоти (3) у 10 мл безводного діоксану додають (0,055 моль) *N,N*-карбонілдімідазолу та нагрівають на водяній бані при 60–80°C протягом 1 години, захищаючи від вологи повітря за допомогою хлоркальцієвої трубки. Після цього до реакційної суміші при перемішуванні додають 0,055 моль відповідного аміну й нагрівають протягом 3–5 годин. Розчинник відганяють під вакуумом, а залишок розтирають водно-спиртовою сумішшю. Утворені осад відфільтровують.

4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]-тріазин-7-карбонова кислота (5). До 0,01 моль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]-тріазин-7-карбонової кислоти (1) додають 20 мл 20% водного розчину NaOH і нагрівають на водяній бані протягом 60–90 хв. Охолоджують і підкислюють хлористоводневою кислотою до pH 3–4, утворений осад відфільтровують.

Гідризинова сіль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]тріазин-7-карбонової кислоти (6). 0,01 моль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]-тріазин-7-карбонової кислоти (1) розчиняють у 20мл ізопропілового спирту при нагріванні. Потім додають 0,02 моль гідразингідрату та кип'яють протягом 1 години. Реакційну масу після охолодження виливають в 50 мл води. Осад, що утворився, відфільтровують.

Морфолінієва сіль етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-*d*][1,2,4]тріазин-7-карбонової кислоти (7). 0,00749 моль етилового естеру

¹H ЯМР-спектри синтезованих сполук

№ сп.	R	δ, м. д.						
		NH (с. 1H)	NHCO- (с. 1H)	-SH	(CH ₂ S) с. 2H)	OCH ₂ CH ₃ (т. 3H), (кв. 2H)	CH ₃ (Py) (с.3H) (с.3H)	R
1	–	12.23	–	14.56	–	1.25, 4.15	2.41	–
2a	C ₂ H ₅	–*	–	–	–	1.38, 4.18	2.43	1.26 м.д. т (3H. CH ₃ CH ₂). 3.26 м.д. кв (2H. CH ₃ CH ₂)
2b	CH ₂ =CHCH ₂	11.85	–	–	–	1.26, 4.16	2.47, 2.49	3.91 м.д. д (2H. CH ₂ =CHCH ₂). 5.11-5.35 м.д. м (2H. CH ₂ =CHCH ₂). 5.96 м.д. м (1H. CH ₂ =CHCH ₂).
2c	CH ₂ C ₆ H ₄ -4-Br	12.15	–	–	–	1.26, 4.17	2,44	4.47 с (2H, CH ₂), 7.35 д (2H, Ar), 7.53 д (2H, Ar)
2d	CH ₂ COOC ₂ H ₅	11.85	–	–	–	1.26, 4.21	2.43, 2.44	1.18 т (3H, OCH ₂ CH ₃), 4.26 с (2H, CH ₂), 4.12 кв. (2H, OCH ₂ CH ₃)
2e	CH(COOC ₂ H ₅) COCH ₃	11.58	–	–	–	1.26, 4.14	2.43, 2.44	1.16 т (3H, OCH ₂ CH ₃), 2.45 с (3H, CH ₃), 4.19 кв. (2H, OCH ₂ CH ₃), 4.23 с (1H, CH)
3	CH ₂ COOH	11.85	–	–	–	1.26, 4.21	2.43, 2.44	14.02 с (1H, OH), 4.47 с (2H, CH ₂)
4a	C ₆ H ₅	12.18	10.36	–	4.27	1.24, 4.16	2.36, 2.40	7.55 д (2H, Ar). 7.05 т (1H, Ar). 7.30 т (2H, Ar)
4b	CH ₂ C ₆ H ₅	12.18	8.77	–	4.29	1.26, 4.18	2.43, 2.45	4.12 с (2H.CH ₂). 7.25 с (5H, Ar)
4c	2-CH ₃ C ₆ H ₅	12.23	9.73	–	4.31	1.26, 4.16	2.43, 2.45	7.08-7.40 м (4H, Ar)
4d	3-CH ₃ C ₆ H ₅	12.19	10.31	–	4.27	1.27, 4.16	2.43	2.25 с (3H.ArCH ₃). 6.86 д (1H, Ar). 7.18 т (1H, Ar). 7.32 д (1H, Ar). 7.40 с (1H, Ar)
4e	4-CH ₃ C ₆ H ₅	12.18	10.32	–	4.28	1.26, 4.18	2.38, 2.41	7.08 д (2H, Ar). 7.44 д (2H, Ar). 2.21 с (3H. CH ₃)
4f	2,4-CH ₃ C ₆ H ₅	12.21	9.65	–	4.29	1.26, 4.16	2.43, 2.45	2.12 с (3H.ArCH ₃). 2.22 с (3H.ArCH ₃). 6.94 д (1H, Ar). 7.00 с (1H, Ar). 7.22 д (1H, Ar).
4g	2-CH ₃ -4- HOCC ₆ H ₅	12.21	9.79	–	4.50	1.26, 4.18	2.43, 2.45	
4h	2-CH ₃ OC ₆ H ₅	12.22	9.64	–	4.34	1.26, 4.16	2.43	6.81-7.19 м (3H, Ar). 7.92 д (1H, Ar)
4i	4-CH ₃ OC ₆ H ₅	12.20	10.25	–	4.26	1.25, 4.16	2.43	6.86 д (2H, Ar). 7.46 д (2H, Ar). 3.70 с (3H. OCH ₃)
4j	2-NO ₂ - 4-CH ₃ OC ₆ H ₅	12.19	10.51	–	4.29	1.26, 4.16	2.43	7.27-7.66 м (3H, Ar)
4k	4-BrC ₆ H ₅	12.18	10.54	–	4.28	1.26, 4.16	2.42	4.45-4.57 м (4H, Ar)
4l	2-IC ₆ H ₅	12.21	9.88	–	4.31	1.26, 4.16	2.43	
4m	нафтіл-1	12.32	10.51	–	4.49	1.26, 4.16	2.44, 2.45	4.43-4.56 м (3H, Ar). 7.65 д (1H, Ar). 7.77 д (1H, Ar). 7.92 д (1H, Ar). 8.10 д (1H, Ar)
4n	4-амідопірино	12.18	9.55	–	4.21	1.26, 4.16	2.41, 2.46	2.08 с (3H.CH ₃). 3.04 с (3H.CH ₃). 7.34 д (2H, Ar). 7.49 т (3H, Ar)
4o	піридил-2	12.18	10.87	–	4.33	1.25, 4.15	2.41, 2.42	7.11 т (1H, Ar). 7.77 т (1H, Ar). 8.02 д (1H, Ar). 8.33 д (1H, Ar)
4p	морфоліл-1	12.18	–	–	4.49	1.26, 4.16	2.43, 2.46	3.42-3.64 м (4H, Ar)
4q	піперидил-1	12.19	–	–	4.49	1.26, 4.16	2.43, 2.45	
4r	диетиламіно	12.20	–	–	4.47	1.26, 4.16	2.43, 2.45	1.01 т (3H. CH ₂ CH ₃). 1.15 т (3H. CH ₂ CH ₃). 3.27 к (2H. CH ₂ CH ₃). 3.38 (3H. CH ₂ CH ₃)
5	–	12.08	–	14.55	–	–	2.43	12.19 м.д. с (1H. COOH).
6	–	12.18	–	14.56	–	1.25, 4.16	2.38, 2.40	7.08-7.62 (NH ₃ ⁺). 9.19 (NH ₂)
7	–	–	–	–	–	–	–	–
8	–	11.05	–	–	–	–	2.24, 2.26	3.50 м.д. уш с (2H. NH ₂ NH). 8.50 м.д. с (1H. NH ₂ NH). 4.20 м.д. уш с (2H. NH ₂ NHCO). 8.60 м.д. с (1H. NH ₂ NHCO)



Антиоксидантна й антирадикальна активність досліджуваних сполук

№ сполук	Неферментативне ініціювання ВРО				Інгібування супероксидрадикалу			
	10 ⁻³ М		10 ⁻⁵ М		10 ⁻³ М		10 ⁻⁵ М	
	МДА, ммоль/мл*	АОА, %	МДА, ммоль/мл*	АОА, %	Оптична густина, D*	АРА, %	Оптична густина, D*	АРА, %
інтакт	0,03±0,002		-		-		-	
контроль	0,71±0,003		-		0,52±0,006		-	
Тіотриазолн	0,42±0,003	40,8	-		0,37±0,004	32,7	-	
2b	0,42±0,003	40,8	0,52±0,005	26,8	0,18±0,003	65,4	0,52±0,008	0
4a	0,4±0,003	43,7	0,3±0,002	57,7	0,3±0,004	42,3	0,25±0,002	51,9
4b	0,31±0,002	56,3	0,2±0,001	71,8	0,28±0,003	46,2	0,26±0,003	50,0
4c	0,42±0,001	40,8	0,35±0,002	50,7	0,37±0,002	28,8	0,3±0,002	42,3
4d	0,55±0,003	22,5	0,5±0,002	29,6	0,47±0,001	9,62	0,38±0,004	26,9
4e	0,36±0,003	49,3	0,27±0,003	62,0	0,31±0,001	40,4	0,27±0,002	48,1
4f	0,28±0,004	60,5	0,22±0,004	69,0	0,21±0,002	59,6	0,17±0,002	67,3
4h	0,4±0,002	43,7	0,37±0,002	47,9	0,31±0,002	40,4	0,28±0,002	46,2
4i	0,48±0,001	32,4	0,4±0,001	43,7	0,41±0,003	21,2	0,37±0,001	28,8
4j	0,61±0,005	14,1	0,55±0,003	22,5	0,45±0,001	13,5	0,36±0,003	30,8
4l	0,31±0,003	56,3	0,27±0,002	62,0	0,34±0,002	34,6	0,3±0,002	42,3
4m	0,43±0,003	39,4	0,33±0,003	53,5	0,42±0,003	19,2	0,35±0,001	32,7
4n	0,32±0,002	45,9	0,26±0,003	63,4	0,25±0,002	51,9	0,2±0,001	61,5
4o	0,27±0,004	62,0	0,2±0,002	71,8	0,18±0,001	65,4	0,14±0,003	73,1
4p	0,4±0,003	43,7	0,33±0,003	53,5	0,35±0,001	32,7	0,3±0,001	42,3
4q	0,31±0,004	56,3	0,25±0,002	64,8	0,25±0,002	51,9	0,2±0,003	61,5
4r	0,2±0,003	71,8	0,15±0,001	78,9	0,21±0,003	59,6	0,17±0,001	67,3

Примітки: * – достовірно відносно контролю (p≤0,05).

Таблиця 4

АОА досліджуваних сполук при ОМБ (пригнічення утворення карбонільних (АФГ) і карбоксильних груп (КФГ)) в умовах ініціювання ВРО

№№ сполук	АФГ				КФГ			
	10 ⁻³ М		10 ⁻⁵ М		10 ⁻³ М		10 ⁻⁵ М	
	Оптична густина λ=274нм	АОА, %	Оптична густина λ=274нм	АОА, %	Оптична густина λ=363нм	АОА, %	Оптична густина λ=363нм	АОА, %
інтакт	0,14±0,005		-		0,12±0,002		-	
контроль	3,2±0,005		-		2,8±0,007		-	
Тіотриазолн	1,21±0,004	56,8	-		1,0±0,002	56,5	-	
2b	0,63±0,006	80,3	0,87±0,008	72,8	0,52±0,003	81,4	0,51±0,007	81,8
4a	1,6±0,003	50,0	0,8±0,005	75,0	1,3±0,003	53,6	0,63±0,003	77,5
4b	1,1±0,005	65,6	0,65±0,003	79,7	0,78±0,003	72,1	0,5±0,005	82,1
4c	1,7±0,003	46,9	0,94±0,003	70,6	1,3±0,005	53,6	0,8±0,004	71,4
4d	2,4±0,005	25,0	1,1±0,005	65,6	1,8±0,004	35,7	0,95±0,004	66,1
4e	1,8±0,004	43,8	0,63±0,001	80,3	1,1±0,003	60,7	0,52±0,005	81,4
4f	0,98±0,002	69,4	0,7±0,003	78,1	0,83±0,005	70,4	0,62±0,003	77,9
4h	2,0±0,005	37,5	1,1±0,002	65,6	1,78±0,002	36,4	0,73±0,003	73,9
4i	2,9±0,003	9,38	1,6±0,002	50,0	2,5±0,003	10,7	1,1±0,002	60,7
4j	2,86±0,004	10,6	1,7±0,003	46,9	2,1±0,005	25,0	1,2±0,005	57,1
4l	1,5±0,005	53,1	0,81±0,003	74,7	1,0±0,002	64,3	0,72±0,002	74,3
4m	2,1±0,004	34,4	1,4±0,004	56,3	1,8±0,005	35,7	1,2±0,002	57,1
4n	2,0±0,003	37,5	0,93±0,005	70,9	1,5±0,004	46,4	0,8±0,005	71,4
4o	1,80±0,003	43,8	0,76±0,005	76,3	1,2±0,003	57,1	0,71±0,005	74,6
4p	1,6±0,005	50,0	0,85±0,004	73,4	1,3±0,002	53,6	0,72±0,005	74,3
4q	1,7±0,002	46,9	0,77±0,003	75,9	1,5±0,003	46,4	0,67±0,004	76,1
4r	1,7±0,004	46,9	0,8±0,003	75,0	1,3±0,002	53,6	0,63±0,003	77,5

Примітка: * – достовірно відносно контролю (p≤0,05).

Протимікробна та протигрибкова активності синтезованих сполук (метод А)*

№ сполук	Концентрація, %	Діаметр зон пригнічення росту мікроорганізмів, мм				
		<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Myc. luteum</i>	<i>C. tenuis</i>	<i>A. niger</i>
2b	0,5			15		
	0,1			12		
4d	0,5	0	7	7	13,6	7
	0,1	0	0	6	11	0
4m	0,5	0	11	8	16	0
	0,1	0	0	0	0	0
4n	0,5	0	7	7	12	8
	0,1	0	0	0	7	0
4p	0,5	0	8	7	8,3	0
	0,1	0	0	0	7	0
ванкомицин	0,01	16	18	58	0	0
ністатин	0,01	0	11	15	24	25
оксацилін	0,01	0	21	0	0	0

Примітка:* – сполуки 4b, 4e, 4i, 4o, 4c, 4h, 4f, 4j, 4q, 4r у досліджуваних концентраціях не пригнічували ріст мікроорганізмів.

Таблиця 6

Показники мінімальної бактерицидної (МБЦК), мінімальної бактеріостатичної (МБСК), мінімальної фунгіцидної (МФЦК) та мінімальної фунгістатичної (МФСК) концентрацій сполук методом серійних розведень (метод Б)*

№ сполук	Культури бактерій						Культури грибів			
	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>		<i>Myc. luteum</i>		<i>C. tenuis</i>		<i>A. niger</i>	
	МБСК, мкг/мл	МБЦК, мкг/мл	МБСК, мкг/мл	МБЦК, мкг/мл	МБСК, мкг/мл	МБЦК, мкг/мл	МФСК, мкг/мл	МФЦК, мкг/мл	МФСК, мкг/мл	МФЦК, мкг/мл
2b			62,5	125			7,8	15,6	125	
4b	+	+	+	+	+	+	15,6	31,2	+	+
4e	+	+	+	+	+	+	15,6	31,2	+	+
4d	500	*	+	+	+	+	500	*	500	*
4i	+	+	+	+	+	+	15,6	31,2	+	+
4m	+	+	+	+	+	+	3,9	7,8	+	+
4n	+	+	125	*	+	+	500	*	500	*

Примітка: * – для сполук 4o, 4c, 4h, 4f, 4j, 4q, 4p, 4r у досліджуваних концентраціях біоцидний ефект не визначено (спостерігався ріст мікроорганізму); + – у досліджуваних концентраціях біоцидний ефект не виявлено (спостерігався ріст мікроорганізму); * – у досліджуваних концентраціях показників біоцидний ефект не встановлений.

4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти (1) розчиняють при нагріванні в 15 мл морфоліну та кип'ятять 3 години. Осад, що утворився після охолодження реакційної маси, відфільтровують і кристалізують з ацетонітрилу.

4-Гідразино-1-гідрокси-6,8-диметилпіроло[1,2-d][1,2,4]триазин-7-карбогідразид (8). Суміш 0,00339 моль 4-етилмеркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло [1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти (2a), 4 мл 85% гідразингідрату і 3 мл етанолу кип'ятять протягом 8 годин, після чого суміш охолоджують. Осад, що утворився, відфільтровують.

Експериментальна біологічна частина

Оцінку АОА сполук (4) у досліді in vitro проводили на кафедрі фармацевтичної хімії ЗДМУ на моделях ініціації утворення вільних радикалів: інгібування супероксидрадикалу та ферментативного ініціювання ВРО [4]. Окисну модифікацію білка проводили в гомогенаті мозку щурів лінії Вістар за відомою методикою [5]. АОА (%) визначають за пригніченням утворення карбонільних (АФГ) і карбоксильних (КФГ) груп в умовах ініціювання ВРО [5,6]. Досліджувані сполуки визначали в дозах 10⁻³ і 10⁻⁵ М; тіотриазолін – 10⁻³ М. Статистичну

обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «Biostatistica».

Визначення протимікробної та протигрибкової активності синтезованих сполук проводились на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Метод А. Антимікробну активність сполук вивчали методом дифузії речовин в агарі на твердому поживному середовищі (м'ясо-пептонний агар – для бактерій, сусло-агар – для грибів). Мікробне навантаження – 10⁹ клітин (спор) на 1 мл. Тривалість інкубації бактерій 24 год при температурі 35°C, грибів – 48–72 год при 28–30°C. У досліді використано наступні тест-культури: бактерії *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium luteum* та гриби *Candida tenuis*, *Aspergillus niger*. Ступінь активності досліджуваних сполук оцінювали за величиною зон пригнічення росту тест-культур мікроорганізмів згідно параметрів, що наведено в табл. 6. Повторюваність досліді трьохкратна.

Метод Б. Визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК), мінімальної бактеріостатичної концентрації (МБСК) і мінімальної фунгіцидної концентрації



(МФцК), мінімальної фунгістатичної концентрації (МФсК) сполук проводять методом серійних розведень. Досліджувану речовину розчиняють у відповідному розчиннику (ДМСО), досягаючи необхідної концентрації (від 0,9 до 500 мкг/мл).

Визначення МБсК (МФсК). Певний об'єм розчину речовини вносять у поживне середовище (МПБ (м'ясо-пептонний бульйон) – для бактерій; неохмелене пивне сусло – для грибів). У поживне середовище інокулюють посівний матеріал бактерій або грибів. Засіяні пробірки витримують у термостаті при відповідній температурі (37°C – для бактерій; 30°C – для грибів) протягом 24–72 годин. Результати оцінюють за наявністю чи відсутністю росту мікроорганізмів (за ступенем мікробної мутності поживного середовища).

Визначення МБцК (МФцК). З пробірок, у яких розчини середовища виявились візуально прозорими, відбирають по 0,02 мл і наносять на стерильний МПА (для бактерій) або СА (для грибів) у стерильних чашках Петрі, що інкубують в термостаті. Оцінку результатів здійснюють для тест-бактерій через 24 год, для тест-грибів – 48–72 год. За відсутністю росту колоній мікроорганізмів на інкубованих чашках Петрі визначають мінімальну бактерицидну (МБцК) чи мінімальну фунгіцидну концентрацію (МФцК) досліджуваної речовини. Повторюваність досліджу трьохкратна.

ВИСНОВКИ

Досліджено реакції алкілування, лужного гідролізу, амінолізу та гідразінолізу етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]-триазин-7-карбонової кислоти. Встановлено, що гідразіноліз відбувається неселективно, в умовах тривалого кип'ятіння S-заміщених з утворенням 4-гідразіно-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]триазин-7-карбогідразиду.

Проведені біологічні дослідження показали наявність вираженої антиоксидантної та антирадикальної активності у S-алкілпохідних етилового естеру 4-меркапто-6,8-диметил-1-оксо-1,2-дигідропіроло[1,2-d][1,2,4]триазин-7-карбонової кислоти на різних моделях ініціювання ВРО. Виявлено «сполуку-лідер», запропоновану для подальших досліджень

на ряді модельних патологій, в механізмі розвитку яких провідна роль належить окисним реакціям.

Результати мікробіологічного скринінгу показали, що синтезовані сполуки виявляють помірну протимікробну та протигрибкову активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Astakhina V.O.* Synthesis and reactivity of 4-mercapto-1,2-dihydro-pyrrolo[1,2-d][1,2,4]-triazines / *Astakhina V.O., Harchenko A.V., Voevudsky M.V., Kovalenko S.I.* // V International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles» (CHCN-2009). – Kharkov (Ukraine), 5–9 October, 2009. – P. 2.
2. *Patrizia Diana.* Pyrrolo [2,1-c][1,2,4]triazines from 2-diazopyrroles: synthesis and antiproliferative activity / *Patrizia Diana, Paola Barraja, Antonino Lauria, Alessandra Montalbano, Anna Maria Almerico, Gaetano Dattolo and Girolamo* // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2002. – №37. – P. 267–272.
3. *Hunt JT.* Discovery of the pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine nucleus as a new kinase inhibitor template / *Hunt JT, Mitt T, Borzilleri R, Gullo-Brown J, Fargnoli J et al.* // J Med Chem. – 2004. – №47. – P. 4054–4059.
4. *Губський Ю.І.* Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліджах in vitro: Метод. реком. / *Губський Ю.І., Дунаєв В.В., Бєленічев І.Ф. та ін.* – К.: Державний Фармакологічний центр МОЗ України, 2002. – 26 с.
5. *Сидорова І.В.* Вплив похідних 4-гідразінохіназоліну на окисну модифікацію білка (ОМБ) в умовах ініціювання вільнорадикального окислення in vitro / *Сидорова І.В., Нестерова Н.О., Бєленічев І.Ф., Коваленко С.І.* // Фармаком. – 2004. – №4. – С. 68–73.
6. *Halliwell B.* Free Radicals in Biology and Medicine / *Halliwell B.* – Oxford Press, 1999. – 248 p.
7. *Floyd R.* Antioxidant, oxidative stress and degenerative neurological disorders / *Floyd R.* // P.S.E.B.M. – 1999. – Vol. 222, №1. – P. 236–252.
8. *Floyd R.* Role of oxygen free radicals in brain ischemia / *Floyd R.* // FASEB. – 2003. – Vol. 4, №1. – P. 2587–2597.
9. *Cooper J.R.* The Biochemical Basis of Neuropharmacology / *Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H.* – NY, 1996. – 526 p.
10. *Packer L.* Oxidative stress and Aging / *Packer L.* – Oxford: Clarendon Press, 1995. – 426 p.
11. *Monocada S.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / *Monocada S., Palmer R.M., Higgs E.A.* // Pharmacol. Rev. – 1991. – Vol. 43. – P. 109–142.

Відомості про авторів:

Астахіна В.О., аспірант каф. технології органічних речовин та фармацевтичних препаратів ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет».

Воевудський М.В., к. хім. н., доц. каф. технології органічних речовин та фармацевтичних препаратів ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет».

Коваленко С.І., д. фарм. н., професор каф. фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Комаровська-Порохнянець О.З., к. хім. н., доцент каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Новіков В.П., д. хім. н., професор, зав. каф. технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

Крищик О.В., к. хім. н., доцент каф. технології органічних речовин та фармацевтичних препаратів ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет».

Харченко О.В., д. хім. н., професор, зав. каф. технології органічних речовин та фармацевтичних препаратів ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет».

Адреса для листування:

Астахіна Валерія Олегівна. 49005, м. Дніпропетровськ, пр. Гагаріна, 8, ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет».

Тел. (0562) 68 22 33, e-mail: torfp@list.ru

Рецензент: проф. С.И. Коваленко
Поступила в редакцію 12.11.2010 г.