



Synthesis, physical, chemical and biological properties of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids' derivatives

O. P. Dolhikh, M. I. Romanenko, D. H. Ivanchenko*, K. V. Aleksandrova, N. M. Polishchuk

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

Modern antibiotics and synthetic antimicrobial agents play a leading role in the treatment of bacterial infections. Despite their effectiveness, they cause a number of side effects, and thus the search for new antimicrobial and antifungal agents is currently one of the problems of pharmaceutical science of current interest. Literary data suggest that xanthine derivatives exhibit activity in relation to some strains of pathogenic microorganisms and fungi.

The aim of this work is to develop a method for the synthesis of new derivatives of xanthine-8-aminoalkanoic acids and to study their physical and chemical properties, as well as their antimicrobial and antifungal effects.

Materials and methods. The melting point has been determined with the help of an open capillary method with PTP-M device. Elemental analysis has been performed with the help of the instrument Elementar Vario L cube, NMR-spectra have been taken on a spectrometer Bruker SF-400 (operating frequency of 400 MHz, solvent DMSO, internal standard – TMS). Study of antimicrobial and antifungal activity of synthesized compounds has been performed by a two-fold serial dilution method. Standard test strains have been used for the study: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653. *Dimethylsulfoxide* was used as the solvent of the compounds.

Results. The reaction of 8-brom-7-ethylxanthines with an excess of the corresponding aminoalkanoic acid in an aqueous DMF medium in the presence of an equimolar (in relation to the amino acid) amount of baking soda leads to the formation of the corresponding 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids. Structure of synthesized compounds was definitely proved by ¹H NMR-spectroscopy. Conducting primary screening research of antimicrobial activity of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids derivatives, which revealed moderate and weak activity in concentrations 50–100 mcg/ml.

Conclusions. A preparative method of synthesis of not described in the literature 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids is developed. The structure of the synthesized compounds has been proved with the help of data of the ¹H NMR spectroscopy. The antimicrobial and antifungal effects of the obtained compounds have been studied. The perspective of xanthine-8-alkanoic acids for the further search of biologically active compounds is shown.

Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 7-етилксантиніл-8-аміноалканових кислот

О. П. Долгіх, М. І. Романенко, Д. Г. Іванченко, К. В. Александрова, Н. М. Поліщук

Сучасні антибіотики та синтетичні протимікробні засоби посідають чільне місце в лікуванні бактеріальних інфекцій. Незважаючи на їхню ефективність, вони викликають низку побічних ефектів, а отже пошук нових протимікробних і протигрибкових засобів нині є однією з найактуальніших проблем фармацевтичної науки. Дані фахової літератури свідчать, що похідні ксантину виявляють активність щодо деяких штамів патогенних мікроорганізмів і грибів.

Мета роботи – розробка методу синтезу нових похідних ксантиніл-8-аміноалканових кислот і вивчення їхніх фізико-хімічних властивостей, протимікробної та протигрибкової дії.

Матеріали та методи. Температуру плавлення визначали відкритим капілярним способом на приладі ПТП-М. Елементний аналіз виконали на приладі Elementar Vario L cube, ПМР-спектри зняті на спектрометрі Bruker SF-400 (робоча частота 400 МГц, розчинник ДМСО, внутрішній стандарт – ТМС). Вивчення антибактеріальної та протигрибкової активності синтезованих речовин здійснили за методом дворазових серійних розведень. Для дослідження застосували стандартні тест-штами: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653. Як розчинник сполук використовували диметилсульфоксид.

Результати. Реакція 8-бромо-7-етилксантинів із надлишком відповідної аміноалканової кислоти в середовищі водного ДМФА за наявності еквімолярної (щодо амінокислоти) кількості харчової соди призводить до утворення відповідних 7-етилксантиніл-8-аміноалканових кислот. Структура синтезованих сполук однозначно доведена методом ¹H ЯМР-спектроскопії. Дослідження протимікробної дії синтезованих сполук показали, що похідні 7-етилксантиніл-8-аміноалканових кислот виявляють помірну та слабку активність у концентраціях 50–100 мкг/мл.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/158921>

UDC: 547.857.4.057.03/04:615.28
DOI: 10.14739/2409-2932.2019.1.158921

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2019; 12 (1), 10–14

Key words: xanthine, organic synthesis, NMR-spectroscopy, antibacterial, antifungal agents.

E-mail: ivanchenko230181@gmail.com

Received: 02.11.2018 // Revised: 21.11.2018 // Accepted: 10.12.2018

Висновки. Розроблена препаративна методика синтезу неописаних у фаховій літературі 7-етилксантиніл-8-аміноалканових кислот. За допомогою даних спектроскопії ^1H ЯМР доведена будова синтезованих сполук. Вивчена протимікробна та протигрибкова дія сполук, що отримали. Показана перспективність ксантиніл-8-алканових кислот для дальшого пошуку біологічно активних сполук.

Ключові слова: ксантин, органічний синтез, ПМР-спектроскопія, антибактеріальні, протигрибкові засоби.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2019. – Т. 12, № 1(29). – С. 10–14

Синтез, физико-химические и биологические свойства производных 7-этилксантинил-8-аминоалкановых кислот

О. П. Долгих, Н. И. Романенко, Д. Г. Иванченко, Е. В. Александрова, Н. Н. Полищук

Современные антибиотики и синтетические противомикробные средства занимают лидирующее место в лечении бактериальных инфекций. Несмотря на их эффективность, они вызывают ряд побочных эффектов, следовательно, поиск новых противомикробных и противогрибковых средств – одна из самых актуальных проблем фармацевтической науки. Данные специализированной литературы свидетельствуют, что производные ксантина проявляют активность в отношении некоторых штаммов патогенных микроорганизмов и грибов.

Цель работы – разработка метода синтеза новых производных ксантинил-8-аминоалкановых кислот и изучение их физико-химических свойств, противомикробного и противогрибкового действия.

Материалы и методы. Температуру плавления определяли открытым капиллярным способом с использованием прибора ПТП-М. Элементный анализ выполнили на приборе Elementar Vario L cube, ПМР-спектры сняты на спектрометре Bruker SF-400 (рабочая частота 400 МГц, растворитель ДМСО, внутренний стандарт – ТМС). Изучение антибактериальной и противогрибковой активности синтезированных веществ проводили по методу двукратных серийных разведений. Для исследования использовались стандартные тест-штаммы: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653. В качестве растворителя соединений использовали диметилсульфоксид.

Результаты. Реакция 8-бром-7-этилксантинов с избытком соответствующей аминоалкановой кислоты в среде водного ДМФА в присутствии эквимолярного (по отношению к аминокислоте) количества пищевой соды ведет к образованию соответствующих 7-этилксантинил-8-аминоалкановых кислот. Структура синтезированных соединений однозначно доказана методом ^1H ЯМР-спектроскопии. Исследование противомикробного действия синтезированных соединений показало, что тиопроизводные 7-этилксантинил-8-аминоалкановых кислот проявляют умеренную и слабую активность в концентрациях 50–100 мкг/мл.

Выводы. Разработана препаративная методика синтеза неописанных в специализированной литературе 7-этилксантинил-8-аминоалкановых кислот. С помощью данных спектроскопии ^1H ЯМР доказано строение синтезированных соединений. Изучено противомикробное и противогрибковое действие полученных соединений. Показана перспективность ксантинил-8-алкановых кислот для дальнейшего поиска биологически активных соединений.

Ключевые слова: ксантин, органический синтез, ПМР-спектроскопия, антибактериальные, противогрибковые средства.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2019. – Т. 12, № 1(29). – С. 10–14

Modern antibiotics and synthetic antimicrobial agents play a leading role in the treatment of bacterial infections. Despite their effectiveness, they cause a number of side effects, and thus the search for new antimicrobial and antifungal agents is currently one of the problems of pharmaceutical science of current interest. Literary data suggest that xanthine derivatives exhibit activity in relation to some strains of pathogenic microorganisms and fungi [1–6].

The aim

The aim of this work is to develop a method for the synthesis of new derivatives of xanthine-8-aminoalkanoic acids and to study their physical and chemical properties, as well as their antimicrobial and antifungal effects.

Materials and methods

Reagents from Merk, Avocado, Aldrich companies were used for synthesis.

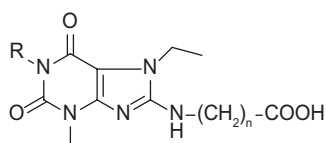
The melting temperature was determined by an open capillary method on the PTP-M device (device for determining the temperature of melting solids, Russia). The elemental analysis was performed on the Elementar Vario L cube device

(Elementar Analysensysteme GmbH, Germany), the NMR spectra were taken on a Bruker SF-400 spectrometer (Bruker Corporation, Germany) (400 MHz operating frequency, DMSO solvent, TMS internal standard). Elemental analysis data is in line with the calculated ones.

Analytical data of synthesized compounds are given in Tables 1, 2.

Table 1. Physical and chemical characteristics of synthesized compounds (3–10)

Compound	M.p., °C	The empirical formula	Yield, %
3	>300	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	40.7
4	>300	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$	44.6
5	298–299	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$	42.9
6	214–215	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$	44.1
7	244–245	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$	40.7
8	189–190	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$	43.3
9	232–233	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$	43.8
10	201–202	$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4$	53.4

Table 2. The values of the chemical shift in ^1H NMR-spectra of synthesized compounds (3–10)

Compound	R	n	δ -scale, ppm							
			N ¹ H (s, 1H)	C ⁸ NH (t, 1H)	N ⁷ CH ₂ (q, 2H)	NCH ₃ (s, 3H)	CH ₂ NH	CH ₃ C (t, 3H)	OH (br. s, 1H)	Other signals
3	H	1	10.59	7.38	4.00	3.19	3.95 (d, 2H)	1.18	12.60	
4	CH ₃	1	–	7.35	4.05	3.25; 3.10	3.95 (d, 2H)	1.18	–	
5	H	2	10.55	7.03	3.93	3.21	3.44 (q, 2H)	1.08	12.09	2.52 (t, 2H) – CH ₂ COO
6	CH ₃	2	–	7.03	3.93	3.25; 3.10	3.46 (q, 2H)	1.09	–	2.52 (t, 2H) – CH ₂ COO
7	H	3	10.52	6.98	3.95	3.22	3.35 (q, 2H)	1.11	12.04	2.24 (t, 2H) – CH ₂ COO 1.75 (m, 2H) – CCH ₂
8	CH ₃	3	–	6.97	3.98	3.25; 3.110	3.35 (q, 2H)	1.10	12.00	2.24 (t, 2H) – CH ₂ COO 1.75 (m, 2H) – CCH ₂
9	H	5	10.52	6.88	3.96	3.23	3.33 (q, 2H)	1.10	11.94	2.17 (t, 2H) – CH ₂ COO 1.49 (m, 4H) – CCH ₂ ; 1.25 (m, 2H) – CCH ₂
10	CH ₃	5	–	6.90	3.99	3.29; 3.12	3.33 (q, 2H)	1.12	11.92	2.14 (t, 2H) – CH ₂ COO 1.50 (m, 4H) – CCH ₂ ; 1.26 (m, 2H) – CCH ₂

Synthesis of 8-brom-3-methyl-7-ethylxanthine (1) is described in work [7], and the synthesis of 8-brom-7-ethyl-theophylline (2) is in work [8].

Synthesis of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids (3–10). A mixture of 0.01 mol of 8-brom-7-ethylxanthine 1 or 2, 0.025 mol of the corresponding amino acid, 2.1 g (0.025 mol) of NaHCO₃, 15 ml of water and 25 ml of DMF are boiled for 6 hours, cooled; 50 ml of water are added, then the mixtures are filtered. The filtrate is acidified to pH = 2 with chloric acid. After two days, the precipitate is filtered off, washed with cold water, and purified by redeposition from aqueous solutions of soda.

The study of antibacterial and antifungal activity of synthesized substances was carried out by the method of serial dilutions. For the study, standard test strains were used: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885–653. All test strips were obtained from the laboratory of the Zaporizhzhia Regional Laboratory Center of State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine.

Basic solution was prepared by dissolving 1 mg of synthesized compound in 1 mL of DMSO. The dilution with the concentration of substance 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was prepared by the adding of 4 mL of Muller-Hinton broth [9] (for 25923 *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) or Sabouraud broth [9] (for *C. albicans* ATCC 885–653) to basic solution. Series of two-fold dilutions were used for preparation of three additional solutions with concentrations 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively (1 mL each). The suspension of microbial culture (0.1 mL) was added

into each test tube. The test tubes with *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* crops were incubated at 37 ± 1 °C for 16–24 hours, with *C. albicans* crops – at 28 ± 1 °C for 44–48 hours. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by visual absence of bacterial growth in the test tube with minimal concentration of investigated compound [10–12].

For determination of minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC), the content of test tube after MIC determination with no bacterial growth was inoculated on 0.1 mL of Muller-Hinton agar [9] (for *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) or on 0.1 mL of Sabouraud agar [9] (for *C. albicans*); cups were incubated at 37 ± 1 °C for 16–24 hours and at 28 ± 1 °C for 44–48 hours respectively. Values of MBC and MFC were detected by visual absence of bacterial growth of cultures.

Furacilinum and ketoconazole were used as comparison benchmarks. The results of the study of antimicrobial and antifungal activity are shown in Table 3.

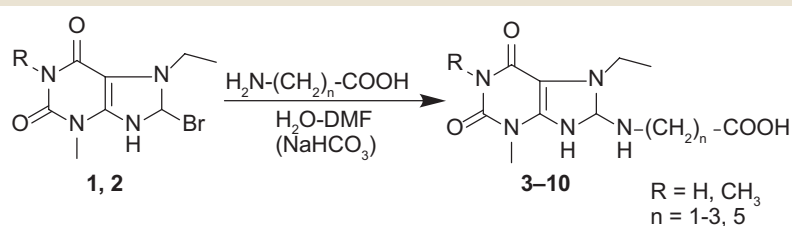
Results and discussion

As shown in the scheme (Fig. 1), the reaction of 8-brom-7-ethylxanthines (1,2) [7,8] with an excess of the corresponding aminoalkanoic acid in an aqueous DMF medium in the presence of an equimolar (in relation to the amino acid) amount of baking soda leads to the formation of the corresponding 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids (3–10).

It must be said that without the addition of soda, the reaction does not occur because amino acids exist in the form of internal salts. Acquired acids 3–10 are white crystalline

Table 3. Antibacterial and antifungal activity of synthesized compounds

Compound	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC, mcg/ml	MBC, mcg/ml	MIC, mcg/ml	MBC, mcg/ml	MIC, mcg/ml	MBC, mcg/ml	MIC, mcg/ml	MFC, mcg/ml
3	100	200	100	200	100	200	50	100
5	100	200	50	200	100	200	50	50
7	100	200	50	200	100	200	50	50
9	100	200	50	200	100	200	50	50
Furacilinum	12.5	12.5	6.25	50	50	800	–	–
Ketoconazole	–	–	–	–	–	–	25	50

**Fig. 1.** Scheme of synthesis of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids (3–10).

compounds soluble in dioxane, DMF, DMSO, slightly soluble in water and ether. The presence of a carboxy group is confirmed by reaction with an aqueous solution of soda (excretion of CO_2).

Finally, the structure of xanthinyl-8-aminoalkanoic acids 3–10 is proved by ^1H NMR spectroscopy (Table 2). In the NMR spectrum of 7-ethyl-3-methylxanthinyl-8-aminobutyric acid (3), two singlets are clearly fixed at 10.59 ppm and 3.19 ppm with a 1:3 intensity distribution, which proves the presence of N^1H - and N^3CH_3 -groups of the uracil part of the molecule. The presence of the N^7 -ethyl substituent is proved by a quartet of 4.0 ppm and a triplet at 1.18 ppm. The NH-group proton in position 8 is recorded in the form of a triplet at 7.38 ppm, and protons of the methylene group form a doublet at 3.95 ppm. In the weakest field, the proton carboxy group is registered in the form of a common singlet at 12.6 ppm. In spectra of other acids, proton signals are recorded in the corresponding field corresponding to the form and intensity.

It should be emphasized separately that all the synthesized xanthinyl-8-aminoalkanoic acids 3–10 are basic compounds for further modification of the xanthine molecule, both along the uracil fragment and the carboxy group.

Analysis of the results of the study of the antimicrobial and antifungal effects of the synthesized compounds (Table 3) indicates that they are practically inactive in relation to *E. coli* and *P. aeruginosa* (their MIC is 100 mcg/ml). Most of the compounds exhibit moderate activity in relation to *S. aureus*. Thus, the administration of glycine to position 8 of the 7-ethyl-3-methylxanthine molecule does not lead to antimicrobial activity in relation to *S. aureus* (MIC = 100 mcg/ml). Replacement of glycine with aminopropane,

aminobutane or aminocaproic acid leads to an increase in antibacterial activity twice (MIC = 50 mcg/ml). It should be noted that the lengthening of the carbon chain in the position 8 of the xanthine nucleus does not affect the bactericidal activity (MBC = 200 mcg/ml). Compounds 3, 5, 7, 9 exhibit a moderate antifungal effect (MIC = 50 mcg/ml) and this indicator is not affected by the length of the carboxylic chain of the aminocarboxylic acid. For the final conclusions, it is necessary to significantly expand the library of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids.

The aforementioned above clearly demonstrates that the expansion of a number of xanthine-8-alkanoic acids and their structural modification may lead to the creation of effective drugs of the noted action.

Conclusions

1. A preparative method of synthesis of not described in the literature 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids is developed.
2. The structure of the synthesized compounds has been proved with the help of data of the ^1H NMR spectroscopy.
3. The antimicrobial and antifungal effects of the obtained compounds have been studied.
4. The perspective of xanthine-8-alkanoic acids for the further search of biologically active compounds is shown.

Funding

The work is carried out within the framework of the initiative research work of the Department of Biological Chemistry on the topic: "Synthesis, Physical-Chemical and Biological Properties of 1,3,7,8-tetra-substituted of xanthine and their condensed derivatives" (state registration № 0115U003873).

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Information about authors:

Dolhikh O. P., Aspirant of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Romanenko M. I., Dr. hab., Professor of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Ivanchenko D. H., PhD, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Aleksandrova K. V., Dr. hab., Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Polishchuk N. M., PhD, Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Відомості про авторів:

Долгих О. П., аспірант каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Романенко М. І., д-р фарм. наук, професор каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Іванченко Д. Г., канд. фарм. наук, доцент каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Александрова К. В., д-р хім. наук, професор, зав. каф. біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Поліщук Н. М., канд. мед. наук, ст. викладач каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Долгих О. П., аспирант каф. биологической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Романенко Н. И., д-р фарм. наук, профессор каф. биологической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Иванченко Д. Г., канд. фарм. наук, доцент каф. биологической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Александрова Е. В., д-р хим. наук, профессор, зав. каф. биологической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Полищук Н. М., канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

References

- [1] Hayallah, A. M., Talhouni, A. A., Alim, A. A. M. A. (2012). Design and synthesis of new 8-anilide theophylline derivatives as bronchodilators and antibacterial agents. *Arch. Pharm. Res.*, 35(8), 1355–1368. doi: 10.1007/s12272-012-0805-4
- [2] Voynikov, Y., Valcheva, V., Momekov, G., Peikov, P., & Stavrov, G. (2014). Theophylline-7-acetic acid derivatives with amino acids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24(14), 3043–3045. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.05.026
- [3] Stavrov, G., Valcheva, V., Voynikov, Y., Philipova, I., Atanasova, M., Konstantinov, S., et al. (2016). Design, synthesis, and antimycobacterial activity of novel theophylline-7-acetic acid derivatives with amino acid moieties. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 87(3), 335–341. doi: 10.1111/cbdd.12676
- [4] Ruddaraju, R. R., Murugulla, A. C., Kotla, R., Chandra Babu Tirumalasetty, M., Wudayagiri, R., Donthabakthuni, S., et al. (2016). Design, synthesis, anticancer, antimicrobial activities and molecular docking studies of theophylline containing acetylenes and theophylline containing 1,2,3-triazoles with variant nucleoside derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 123, 379–396. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.07.024
- [5] Mangasuli, S. N., Hosamani, K. M., Devarajegowda, H. C., Kurjogi, M. M., Joshi, S. D. (2018). Synthesis of coumarin-theophylline hybrids as a new class of anti-tubercular and anti-microbial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 146, 747–756. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.025
- [6] Borowiecki, P., Wińska, P., Bretner, M., Gizińska, M., Koronkiewicz, M., & Staniszewska, M. (2018). Synthesis of novel proxiphylline derivatives with dual Anti-Candida albicans and anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 150, 307–333. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.077
- [7] Prijmenko, B. A., Romanenko, N. I., Garmash, S. N., Klyuev, N. A., Fedulova, I. V., Gnatov, N. I., & Koval, N. V. (1985). Poluchenie 3-metil-8-bromksantina i ego alkilirovanie [Preparation of 3-methyl-8-bromoxanthine and its alkylation]. *Ukrainskij khimicheskij zhurnal*, 51(6), 660–663. [in Russian].
- [8] Romanenko, N. I., Ivanchenko, D. G., Pakhomova, O. A., Shara-pova, T. A., & Korzhova, A. S. (2014). Izuchenie reakcii 7-zame-shchennykh 8-gidrazinoteofilina s acetouksusnym e'firov [Study of the reaction of 7-substituted 8-hydrazinoteophylline with acetoacetic ester]. *Ukrainskij khimicheskij zhurnal*, 80(12), 113–116. [in Russian].
- [9] Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. London, CRC Press.
- [10] Volianskyi, Yu. L., Hrytsenko, I. S., Shyrobokov, V. P., Smirnov, V. V., Biriukova, S. V., Dykyi, I. L., et al. (2004). *Vyvchennia spetsyfychnoi aktyvnosti protymikrobynykh likarskykh zasobiv [The study of the specific activity of antimicrobial medicines: method. recommendations]*. Kyiv. [in Ukrainian].
- [11] Komykhov, S. A., Tkachenko, I. G., Musatov, V. I., Diachkov, M. V., Chebanov, V. A., & Desenko, S. M. (2016). Multicomponent hot-water synthesis of 7-unsubstituted 4,7-dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidines and their antimicrobial and antifungal activity. *ARKIVOC*, 2016(4), 277–287. doi: http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.p009.610
- [12] Komykhov, S. A., Bondarenko, A. A., Musatov, V. I., Diachkov, M. V., Gorobets, N. Yu., & Desenko, S. M. (2017). (5S,7R)-5-Aryl-7-methyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-ols as products of three-component condensation. *Chem. Heterocycl. Compd.*, 53(3), 378–380. doi: 10.1007/s10593-017-2059-z