

## ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ І ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ 4-((5-(ДЕЦИЛТІО)-4-МЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)МОРФОЛІНУ

Б. Киричко, І. Климась

*Полтавський державний аграрний університет*

В. Парченко

*Запорізький державний медико-фармацевтичний університет*

В матеріалах статті висвітлені деякі особливості синтезу та результати визначення протимікробної активності субстанції 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну «*in vitro*».

Сполука 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну є кристалічним порошком світло-жовтого кольору. Отримана сполука легко розчиняється у диметилсульфоксиді, етанолі. Її хімічна формула є стійкою, а будова доведена комплексними методами фізико-хімічного аналізу.

Нашими дослідженнями було встановлено стійку протимікробну дію зазначеної сполуки у 15 % концентрації й за експозиції 15 і 30 хв по відношенню до *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*.

Проведені дослідження є підґрунтям для створення на основі активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну нових лікарських форм, що можуть бути використані для лікування запальних, гнійно-запальних процесів м'яких тканих, піодермій тощо.

**Ключові слова:** *похідні 1,2,4-триазолу, синтез, гнійно-запальні процеси, мікроорганізми, протимікробна активність.*

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Упродовж останніх трьох десятиліть проводиться інтенсивна робота із синтезу, доклінічного і клінічного випробування, а також впровадження у ветеринарну практику сполук на основі 1,2,4-триазолу.

Основний напрямок їх дії – корекція перебігу запальних процесів у тварин (гепатитів, панкреатитів, гострих респіраторних захворювань, хвороб очей, гнійно-запальних процесів м'яких тканин тощо) шляхом імуностимуляції, нормалізації обміну речовин, індукції специфічних противірусних факторів імунокомпетентними клітинами [1].

Зокрема, у ветеринарній медицині добре себе зарекомендував препарат «Трифузол-нео», який застосовують за широкого спектра хвороб у різних видів тварин. При цьому він має потужну антиоксидантну, імуностимулюючу, протизапальну дію.

Однак, запити спеціалістів ветеринарної медицини також спрямовані й на створення та впровадження у ветеринарну практику засобів, лікарських форм з вираженою антисептичною, дезінфікуючою дією.

### АНАЛІЗ АКТУАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Перспективною, у контексті антимікробної активності, розглядається нова сполука – 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфолін, синтезована науковцями Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Взагалі у ветеринарній практиці, за місцевого лікування запальних, гнійно-запальних процесів, піодермій широко застосовуються антибіотики, сульфаніламідні препарати, протизапальні засоби у поєднанні з місцевою хірургічною обробкою та фізіотерапевтичними процедурами. Використання антибіотикотерапії направлене на усунення основного етіологічного чинника – патогенних мікроорганізмів. Водночас, це не завжди дозволяє забезпечити лікувальний ефект. Враховуючи постійно зростаючу антибіотикорезистентність мікрофлори, лікування локальних гнійних осередків, піодермій наявними засобами стає все більш складнішою проблемою, що вимагає постійного удосконалення й оновлення лікарських засобів [2-4].

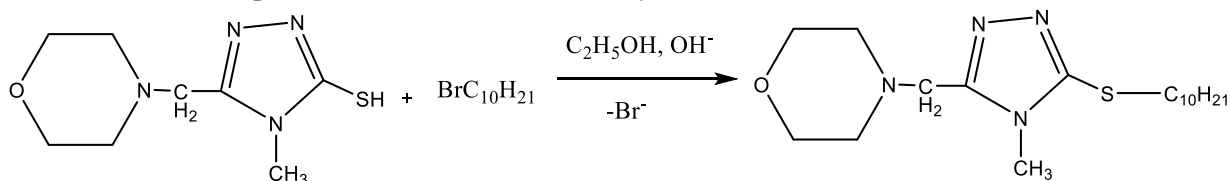
Останнім часом учені приділяють велику увагу проведенню цілеспрямованого синтезу потенційних біологічно активних сполук в ряді S-заміщених 1,2,4-триазолу [6]. Сучасні дослідження фармакологічної активності похідних 1,2,4-триазолу свідчать про досить високу біологічну активність цього класу сполук [7, 8]. При дизайні нових біологічно активних сполук в їх структури часто включають фрагмент 1,2,4-триазолу завдяки його невеликим розмірам і позитивному впливу на водорозчинність сполук [9]. Добре відомим препаратом протигрибкової дії є флуконазол, діюча речовина якого належить до похідних 1,2,4-триазолу [10]. Світові досягнення науковців в галузі хімії гетероциклічних сполук сприяють розвитку органічної хімії в цілому. Особливе місце в органічній хімії займають похідні 1,2,4-триазолу [11]. Це унікальна гетероциклічна система, яка привертає увагу учених різних галузей. В більшості 1,2,4-триазоли малотоксичні сполуки, володіють широким спектром хімічних, біологічних властивостей [12]. Деякі з них є активними фармацевтичними інгредієнтами (АФІ) багатьох ліків, субстанціями регуляторів росту рослин та добрив, біологічно активними сполуками, які знаходяться на етапі доклінічних випробувань тощо [13].

## МЕТА РОБОТИ

Мета роботи полягала у висвітленні особливостей синтезу та визначенні антимікробної активності 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4-((5-(Децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфолін створено в лабораторії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Синтез субстанції було здійснено за класичною методикою. Алкілювання проводили в середовищі етанолу за наявності еквімолекулярних кількостей вихідних компонентів (рис. 1). Синтез здійснено додаванням до вихідного тіолу еквівалентної кількості бромдекану за присутності еквівалентної кількості натрій гідроксиду. З високим виходом отримано 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфолін. Будова речовини доведена за допомогою комплексних фізико-хімічних методів аналізу.



**Рис. 1.** Схема синтезу 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну

Фізичні та хімічні особливості 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну та м'якої лікарської форми лініменту на його основі детально висвітлені у роботі [9].

Визначення антимікробної активності сполуки проводили в умовах бактеріологічного відділу Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області. При цьому керувалися чинними методичними рекомендаціями [5]. Був використаний суспензійний метод, за якого постановку основного дослідження проводили, використовуючи по три стерильні центрифужні пробірки (три повторюваності дослідження) об'ємом 10 мл.

Одночасно з основним дослідженням проводили постановку контролів росту мікробних культур. Для цього, замість робочих розчинів досліджуваної сполуки, вносили по 4,5 мл розчину для розведення і додавали 0,5 мл бактеріальної суспензії відповідних тестових мікроорганізмів.

За постановки основного дослідження після закінчення дії робочих розчинів дослідного зразка на тестові культури мікроорганізмів у певних часових експозиціях, застосовували метод відмивання тестових мікроорганізмів від присутності досліджуваної сполуки. Цей метод забезпечує звільнення оброблених досліджуваною сполукою мікроорганізмів від їхньої присутності шляхом відмивання стерильним розчином для розведення з подальшим осадженням тестових клітин шляхом центрифугування при 3-4 тис. об./хв. упродовж 10 хв. Після центрифугування надосадову рідину зливали, осад ресуспендували у 4,5 мл стерильного розчину для розведення і, надалі, повторювали процедуру трьохразово з центрифугуванням за означеного режиму.

Після останнього центрифугування, надосадову рідину видаляли, осад мікроорганізмів ресуспендували у 4,5 мл стерильного розчину для розбавлення до початкової концентрації і подальшого проведення посівів.

Для визначення результатів антимікробної активності робочих концентрацій досліджуваної сполуки на тестові мікроорганізми та підтвердження відсутності антимікробного ефекту, ресуспендований осад відмитих мікроорганізмів кожної із тестових культур в об'ємі 0,1 мл висівали на чашки Петрі з МПА і пробірки з МПБ у трьох повторюваностях. Потім проводили інкубування посівів упродовж 24-48 годин. Результати випробувань оцінювали через 24-48 годин культивування за наявністю або відсутністю росту мікроорганізмів на МПА і МПБ, порівнюючи з їх інтенсивним ростом у контролі.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Встановлено, що 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфолін являє собою кристалічний порошок світло-жовтого кольору, легко розчинний у диметилсульфоксиді, етанолі. Деякі характеристики речовини наведені у специфікації (табл. 1).

Таблиця 1. Специфікація на субстанцію 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфолін

№ з/п	Показник	Допустимі межі	Методи контролю
1.	Загальна характеристика	Кристалічний порошок світло-жовтого кольору	п. 1, візуально
2.	Розчинність	Легко розчинний у диметилсульфоксиді Р, етанолі Р	п. 2, ДФУ, 1.4
3.	Ідентифікація	3.1 Інфрачервоний спектр поглинання субстанції має відповідати спектру робочого стандартного зразка 3.2 Температура плавлення 70-72 °С 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну 3.3. Позитивна реакція з реактивом Драгендорфа.	п. 3, 3.1 ІЧ-спектрофотометрія, ДФУ 2.2.24 3.2 Фізичний ДФУ 2.2.14 3.3 Хімічний ДФУ 2.3.1
4.	Прозорість розчину	Розчин 0,1 г субстанції у 10 мл диметилсульфоксиду води має бути прозорим	п. 4 ДФУ 2.2.1
5.	Кольоровість розчину	Не > В <sub>9</sub>	п. 4 ДФУ 2.2.2
6.	Кількісне визначення	Від 99,22 % до 101,54 % у перерахунок на безводну вільну від розчинників субстанцію	п. 8 Неводне титрування з потенціометричною фіксацією кінця титрування, ДФУ 2.2.20 або п. 9 газова хроматографія (ГХ), ДФУ 2.2.29
7.	Супутні домішки: вихідний тіол	Не більше 0,78%	п. 9 газова хроматографія (ГХ), ДФУ 2.2.29
8.	Залишкові розчинники:	Не більше 5000 ppm	п. 10 Газова хроматографія,

	Етанол		ДФУ 2.2.28
9.	Мікробіологічна чистота	На 1 г отриманої сполуки допустимо не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно), не допускається <i>Staph. aureus</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	п.12, ДФУ <sup>Н</sup> , 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4 категорія 2

Протимікробну активність зазначеної сполуки досліджували у її 5-10-15-відсотковій концентрації. Експозиція становила 5, 15 і 30 хв. Отримані результати відображені у табл. 2.

Таблиця 2. Протимікробна активність 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну

Назва мікроорганізму, концентрація мікробних клітин	Концентрація сполуки, експозиція (хв.)								
	5%			10%			15%		
	5 хв.	15 хв.	30 хв.	5 хв.	15 хв.	30 хв.	5 хв.	15 хв.	30 хв.
Концентрація мікробних клітин 1 MF ( $3 \cdot 10^8$ )									
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Примітка: «+» наявність росту в МПБ, МПА ; «-» відсутність росту в МПБ, МПА. Нейтралізуючий розчин – ізотонічний розчин натрію хлориду

В результаті встановлено, що 5 і 10 % водні розчини зазначеної субстанції не пригнічують ріст тестових культур *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*.

При збільшенні концентрації досліджуваної сполуки до 15 % було встановлено пригнічення росту означених тестових культур мікроорганізмів на поживних середовищах. За експозиції 15 і 30 хв. 15 % розчину відмічали виражену стійку бактерицидну й фунгіцидну активність по відношенню до культур *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*.

## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Препарати на основі триазолу мають попит серед науковців і практиків галузі ветеринарної медицини. Це пов'язано з тим, що триазолі мають різнобічну біологічну активність, вони не токсичні та не затримуються в організмі [1, 12, 14]. Тому ми вважали за доцільне продовжити роботу із синтезу й вивчення біологічної активності окремих похідних 1,2,4-триазолу.

Вважається, що для нормалізації процесу запалення необхідний вплив на організм різних методів етіотропної та патогенетичної терапії. Оптимальні результати отримують за їх поєднання [1-4].

У ветеринарній медицині для лікування гнійно-запальних процесів та піодермій у тварин найчастіше використовують антибіотики, сульфаніламідні препарати у поєднанні з місцевою обробкою та фізіотерапевтичними прийомами [4]. Використання антибактеріальних препаратів дозволяє усунути основний етіологічний фактор – патогенну мікрофлору. Але використання антимікробних засобів не завжди забезпечує високу терапевтичну ефективність. Це пов'язано з тим, що вони не володіють властивістю руйнувати білки некротичних тканин, які є джерелом утворення ендотоксинів, поживного середовища для розмноження патогенних мікроорганізмів. В зв'язку з цим виникає потреба в розробці препаратів комплексної дії, яка б включала антимікробну, протеолітичну та стимулюючу ріст грануляційної тканини дію [4].

Як свідчать останні наукові дослідження [1, 15], антибактеріальні препарати здатні суттєво активізувати продукцію гідроперекисів ліпідів, дієнових, триєнових кон'югатів та інших вільно радикальних сполук. Це, у свою чергу, сповільнює процеси відновлення.

Відповідно, ми у своїх попередніх дослідженнях [2-4, 16] в якості антимікробних засобів апробували окремі, перспективні на наш погляд, нові похідні 1,2,4-триазолу, що, до того ж, мають антиоксидантну, протизапальну дію. Окремі із них використовуються у якості засобів допоміжної терапії за гнійно-некротичних процесів у тварин.

На сьогоднішній день одним із завдань нашого дослідження є пошук діючої речовини і лікарської форми, які могли б бути використані при лікуванні гнійно-запальних ускладнень хвороб шкіри, зокрема піодермій, у тварин.

## ВИСНОВКИ

1. Здійснено синтез нової хімічної сполуки на основі 1,2,4-триазолу за лабораторних умов, доведено будову синтезованої сполуки, вивчено її фізико-хімічні властивості.

2. Встановлено стійку протимікробну дію зазначеної речовини у 15 % концентрації й за експозиції 15 і 30 хв. по відношенню до *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Субстанція 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4H-1,2,4-триазол-3-іл)морфоліну може бути використана при створенні нових лікарських форм для лікування запальних, гнійно-запальних процесів м'яких тканин, піодермій тощо.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Киричко Б.П. Патогенетичне обґрунтування лікування тварин із запальною хірургічною патологією препаратами з антиоксидантною дією: дис. ...д-ра вет. наук: 16.00.05. Київ, 2010. 366 с.

2. Киричко Б.П., Звенігородська Т.В., Парченко В.В. Вивчення протимікробної дії нових похідних 1,2,4-триазолу. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2012. № 1. С. 185-188.

3. Киричко Б.П., Звенігородська Т.В. Протимікробна дія нових похідних 1,2,4-триазолу (повідомлення 2). Наукові праці Полтавської державної аграрної академії. Серія «Ветеринарна медицина». 2011. № 4. С. 15-20.

4. Киричко Б.П., Челідзе С.С. Вивчення антимікробних властивостей субстанції ВПК-108 при експериментальних гнійних ранах у овець. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2007. № 4. С. 109-111.

5. Гаркавенко Т.О., Коваленко В.Л., Горбатюк О.І. та ін. Методичні рекомендації з визначення бактерицидної активності та контролю відсутності бактериостатичного ефекту дезінфікуючих засобів. Київ, 2020. 38 с.

6. Karpenko, Y., Hunchak, Y., Gutyj, B., Hunchak, A., Parchenko, M., & Parchenko, V. (2022). Advanced research for physico-chemical properties and parameters of toxicity piperazinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1, 2, 4-triazol-3-yl)thio) acetate. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2(36), 18-25.

7. Karpenko Yuriy, Gulnur Kusdemir, Parchenko Volodymyr, Burak Tüzün, Parham Taslimi, Omer Faruk Karatas, Khilkovets Anastasia, Parchenko Maryna & Koray Sayın (2023) A biochemistry-oriented drug design: synthesis, anticancer activity, enzymes inhibition, molecular docking studies of novel 1,2,4-triazole derivatives, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, DOI:10.1080/07391102.2023.2253906

8. Bihdan O.A., Parchenko V.V. Chemical modification and Physicochemical properties of new derivatives 5-(thiophen-3-ylmethyl)-4-R1-1,2,4-triazole-3-thiol. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021; 14(9):4621-9. doi:10.52711/0974-360X.2021.00803

9. Hunchak V. M., Martynshyn V. P., Gutyj B. V. et al. Impact of 1,2,4-thio-triazole derivative-based liniment on morphological and immunological blood parameters of dogs suffering from dermatomycoses. *Regul. Mech. Biosyst.*, 2020, 11(2), p. 294-298.

10. Surov A. O., Voronin A. P., Vasilev N. A. et al. Cocrystals of Fluconazole with Aromatic Carboxylic Acids: Competition between Anhydrous and Hydrated Solid Forms. *Crystal Growth & Design* :American Chemical Society, 2020. Vol. 20, № 2. P. 1218-1228. doi:10.1021/acs.cgd.9b01490.

11. Данільченко Д.М., Парченко В.В. Antimicrobial activity of new 5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives. *Запорізький мед. журнал*. 2017. № 1(100), Т. 19. С. 105 – 107.

12. Parchenko V.V. Synthesis, physico-chemical and biological properties of the 1,2,4-triazole-3-thione 5-furilderivatives: Dis .... Dr. of Pharm. Sciences. Zaporizhya, 2014. P. 361.

13. Bihdan O. A., Parchenko V. V. Some aspects of synthesis 3-(2-florphenyl)-6-R<sub>1</sub>-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]thiadiazole and 3-(2-, 3-ftorphenyl)-6-R<sub>2</sub>-7H[1,2,4]triazolo[1,3,4]tiadiazines. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2018. № 9(3). P. 463-470.

14. Каплаушенко А.Г., Книш Є.Г., Панасенко О.І. Синтез, перетворення і біологічна активність в ряду 5-[2-, (3-, 4-) -нітрофеніл]-2,4-дигідро-1,2,4-тріазоліл-3-тіонів. Мед. хімія. 2005. Т. 7, № 3. С. 98–101.

15. Киричко Б.П. Вивчення антиоксидантної активності деяких похідних 1,2,4-тріазолу. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2007. № 2. С. 125–126.

16. Парченко В.В. Маковик Ю.В., Книш Є.Г. Вивчення протимікробної і протигрибкової активності деяких похідних 5-гетерил-2,4-дигідро-1,2,4-тріазол-3-тіонів, 2-бензилиден-1,2,4-тріазоло-(3,4-В)-тіазол-3-(2Н)-онів і бензилиден-гідразидів-5-гетарил-2,4-дигідро-1,2,4-тріазол-3-меркаптооцтових кислот. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. Запоріжжя, 2004. Вип. XII. С. 72–76.

#### FEATURES OF SYNTHESIS AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SUBSTANCE 4-((5-(DECILTHIO)-4-METHYL-4H-1,2,4-TRIAZOLE-3-IL) MORPHOLINE

B. Kyrychko, I. Klymas

*Poltava State Agrarian University*

V. Parchenko

*Zaporizhzhya State Medical and Pharmaceutical University*

In materials of the article some features of synthesis and results of determination of antimicrobial activity of substance are lighted up 4-((5-(decilthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-il) morpholine of "in vitro".

Substance 4-((5-(decilthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-il) morpholine is crystalline powder of light yellow color. The got connection easily dissolves in dimethylsulfoxide, ethanol. Her a chemical formula is a bar, and an unicity is well-proven by the complex methods of physical and chemical analysis.

By our researches the proof antimicrobial action of substance was set 4-((5-(decilthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-il) morpholine 15 % and for displays 15 and 30 хв in relation to *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Undertaken studies are soil for creation on the basis of 4-((5-(decilthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-3-il) morpholine of new medical forms, that can be used for treatment of the inflammatory, festering-used for setting fire processes of soft woven, pyodermas and others like that.

**Key words:** *derivatives of 1,2,4-triazole, synthesis, festering-used for setting fire processes, microorganisms, antimicrobial activity.*