

Wallr., *Valeriana tuberosa* L. у порівнянні з іншими видами роду *Valeriana* L.: дис.. канд. фармац.наук.-Запоріжжя, 2010.-195 с.

26. Thies P. W. Über die wirkstoffe des baldrians. I. Mitt. machweis und isolierung von sedativ *Valeriana* und *Kentranthus*-Arten / Thies P. W., Funke S. // *Tetrahedron Letters*. – 1966. – V. 11. – № 7. – P. 1155–1162.

27. Thies P. W. Über die wirkstoffe des baldrians. X. Die konfiguration des *Valtratum* und anderer *Valepotriate* / Thies P. W., Finner E., Rosskopf F. // *Tetrahedron Letters*. – 1973. – V. 19. – № 20. – P. 4213–4226.

28. Thies P. W. Über die wirkstoffe des baldrians. XIV. Konstitutive zuordnung der acyloxysubstituenten in *valepotriaten* via C^{13} NMR-Spektroskopie / Thies P. W., Finner E., David S. – *Planta med.* – 1981. – V. 41. – № 1. – P. 15–20.

29. Three-membered ring sesquiterpenoides with NGP potentiating activity from the roots of *Valeriana fauriei* / Guo Y, Xu J., Li Y. [et al.] // *Planta Med.* – 2006. – № 74 (4). – P. 373–375.

УДК 543.632.514.6:547.631.7]+547-304.3]:543.51'544.5.068.7:615.31.012

**ДОСЛІДЖЕННЯ ХАРАКТЕРИСТИК УТРИМУВАННЯ РЯДУ
ГІДРАЗІДІВ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ І ГІДРАЗІНОКАРБОТІОАМІДІВ,
ВИХІДНИХ РЕЧОВИН ПРИ СИНТЕЗІ СУБСТАНЦІЙ
ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ МЕТОДОМ
ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС**

Б.О. Варинський

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, Україна

Резюме. *Метою роботи було дослідження характеристик утримання деяких речовин, напівпродуктів в синтезі солей 1,2,4-тріазолтіоацетатних кислот за допомогою ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС. Колонка Zorbax SB-C18, 30 мм x 4.6 мм, 1.8 мкм. Встановлена залежність коефіцієнта ємності k' від вмісту ацетонітрилу для гідразидів карбонових кислот та гідразінокарботіоамідів. Встановлено взаємозв'язок між $\log P$, $\log D$ та коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісту ацетонітрилу.*

Ключові слова: *характеристики утримання, гідразиди карбонових кислот, гідразінокарботіоаміди, ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС.*

Вступ. Похідні 1,2,4-тріазолу є потенційними лікарськими речовинами з різноманітною біологічною активністю. Контроль стадій отримання таких сполук на дослідницькому і виробничому етапі є важливим завданням сучасної фармацевтичної науки. Найбільш універсальним і селективним методом, що дозволяє підтверджувати структуру, визначати кількості аналітів в таких дослідженнях є ВЕРХ-УФ та ВЕРХ-МС.

Необхідною вимогою розробки методик високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетової та мас-спектрометричною детекцією (ВЕРХ-УФ та ВЕРХ-МС) є оптимізація мас-спектрометричного детектування і хроматографічного розділення. Для того щоб підібрати оптимальні умови хроматографічного визначення напівпродуктів та сировини при синтезі солей 1,2,4-тріазолтіоацетатних кислот, з яких деякі вже зареєстровані і використовуються в сучасній ветеринарії (тріфузол, румосол), деякі (тіокс) знаходяться на стадії реєстрації і впровадження у виробництво і можуть бути використовувани в військовій медицині при гіпоксичному стані, необхідно було дослідити залежність утримання від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі, якій є найбільш суттєвим фактором, що впливає на утримування сполук при їх хроматографуванні.

Існує багато робіт в яких досліджувалося утримання різних сполук від структури сорбатів та від властивостей сорбатів. Лінійну залежність між логарифмами коефіцієнтів розподілу та коефіцієнта ємності можна знайти в монографії [1]:

$lgk' = a + lgP_{ij}$ де P_{ij} – коефіцієнт розподілу речовин між фазами і та j.

Наприклад це може бути коефіцієнт розподілу між октанолом та водою:

$$logP_{\text{окт/вода}} = \log \left(\frac{[\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{неіоніз}}}{[\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{неіоніз}}} \right) \quad (1)$$

Ряд публікацій присвячено дослідженню взаємозв'язку між характеристиками утримання та коефіцієнтами розподілу, які найчастіше використовують для визначення характеристик ліофільності із результатів утримання в обернено-фазовій ВЕРХ (ОФ ВЕРХ) [2-9]. Авторами [10] наведено дані щодо визначення ліофільності нових тіосемікарбазидів та похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів на підставі результатів ОФ ВЕРХ та теоретичних розрахунків. F. Lombardo із співавторами [11] досліджували залежності утримання та LogD (2) щодо іоногенних сполук.

$$logD_{\text{окт/вода}} = \log \left(\frac{[\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{іоніз}} + [\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{неіоніз}}}{[\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{іоніз}} + [\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{неіоніз}}} \right) \quad (2)$$

Визначені залежності в більшості робіт пропонується використовувати для експериментального визначення LogP, LogD, які є важливими показниками при вивченні ADME (адсорбції, дістриб'юції, метаболізму та екскреції).

Утримання сполук також залежить від властивостей рухомої фази, зокрема від концентрації органічного модифікатора. Так існує лінійна залежність між логарифмом коефіцієнта ємності та вмістом органічного розчинника [12]:

$$lgk' = a - b(\%B),$$

де %B- процентний вміст органічного модифікатора, а та b – константи. Існує декілька робіт які наводять результати досліджень залежності утримання від вмісту ацетонітрилу [13-15].

Метою цього дослідження є вивчення залежності часу утримання від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі для ВЕРХ-УФ та ВЕРХ-МС визначення ряду гідрозидів карбонових кислот і гідразинокарбоніамідів, речовин - напівпродуктів у синтезі солей 1,2,4-тріазолуксусних кислот, зареєстрованих та потенційних лікарських речовин, по 8 схемах синтезу.

Матеріали та методи дослідження. Прилад LC MS: Agilent 1260 Infinity HPLC System (дегазатор, бінарний насос, автосамплер; одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з іонізацією в електро-спреї (ESI); програмний комплекс OpenLAB CDS. Колонка

Сполуки. Субстанцію ізоніазиду (1') кваліфікації ХЧ було придбано в компанії «Укроргсинтез». Використовувались субстанції сполук, які були синтезовані в Запорізькому державному медичному університеті на кафедрах токсикологічної і неорганічної хімії та фізколоїдної хімії, склад яких було доведено за допомогою ПМР, ІЧ, хромато-мас-спектрометричного аналізу: фуран-2-карбогідразид (2'), 2-морфоліноацетогідразид (3'), 2-метоксибензогідразид (4'), 2-ізонікотіноіл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карбатіоамід (5'), 2-(фуран-2-карбоніл)-N-фенілгідразин-1-карбатіоамід (6'), 2-(2-морфоліноацетіл)-N-фенілгідразин-1-карбатіоамід (7'), N-метіл-2-(2-морфоліноацетіл)гідразин-1-карбатіоамід (8'), 2-(2-метоксибензоіл)гідразин-1-карбатіоамід (9').

Ацетонітрил кваліфікації для ВЕРХ, Merck KGaA (Darmstadt, Germany), формиатна кислота (100 %), Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Високоочищена вода (18 МЩ при 25 °С) була виготовлена з використанням системи очищення води Direct Q 3UV Millipore (Molsheim, France).

Неважку речовини масою 1 мг розчиняли в 1 мл 50% ацетонітрилу.

Програме забезпечення. Програмний комплекс ACDLabs 6.0.

Умови проведення ВЕРХ-МС дослідження: 1) ізократичний режим, з використанням буферного розчину: А - $H_2O(HCOOH\ 0.1\ \%)$ та розчину органічного модифікатору: В - $CH_3CN(HCOOH\ 0.1\ \%)$ – від 3 до 100% В; 2) Колонка Zorbax SB-C18, 30 мм x 4.6 мм, 1.8 мкм; 3) Температура колонки: 40 °С; 2) швидкість потоку елюенту 0,4 мл/хв; 3) джерело іонів: електроспреї (API-ES); 4) SIM режим реєстрації іонів, відповідно до молекулярної маси сполук (табл. 1); 5) позитивна полярність; 6) швидкість газу осушувачу (азоту) -10 л/хв; 7) напруга на капілярі 4000 В. Попередніми дослідженнями нами було визначено оптимальні умови роботи джерела іонізації (табл. 1).

Результати дослідження та обговорення. Нами було експериментально досліджено залежність коефіцієнта ємності k' для діодно-матричного та мас-спектрометричного детектору від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі (рис. 1-4). Можна зазначити, що для гідрозидів карбонових кислот (1'-4') спостерігається на початку зменшення коефіцієнту ємності зі зростанням

Таблиця 1

Оптимальні умови іонізації в електроспрєї (Т- температура газу осушувача, U – напруга на фрагмента торі, Р– тиск на небулайзері)

Речовини	SIM, m/z	Оптимальні умови		
		T	U	P
1'	138	100	133	60
2'	127	197	0	60
3'	160	100	0	60
4'	167	100	0	53
5'	303	138	134	55
6'	262	100	106	53
7'	295	100	129	49
8'	233	100	101	49
9'	226	105	0	39

вмісту ацетонітрилу (обернено-фазовий механізм утримання), а потім (більше 80% ацетонітрилу) зростання коефіцієнту ємності (іоно-обмінний механізм взаємодії з сіланоільними групами азотовмісних катіонів). В разі ж гідразинокарбатиоамідів ми бачимо виключно обернено-фазовий механізм утримання).

На рис. 7 та 8 наявні графіки залежності логарифма коефіцієнта ємності від вмісту ацетонітрилу для мас-спектрометричного детектору.

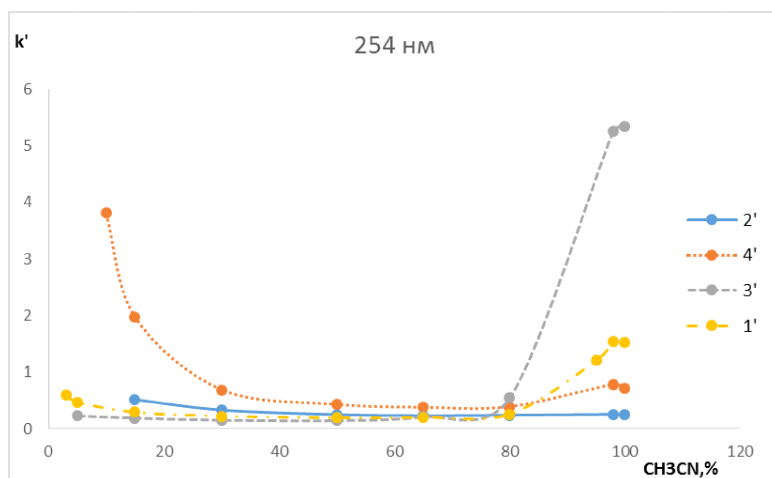


Рис.1. Залежність коефіцієнта ємності (k') гідрозидів (1'-4') від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодноматричному детекторі за довжиною хвилі 254 нм

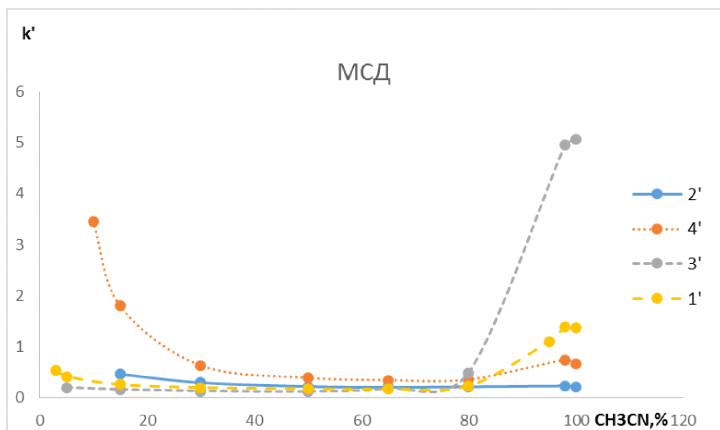


Рис.2. Залежність коефіцієнта ємності (k') гідразидів карбонових кислот (1'-4') від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

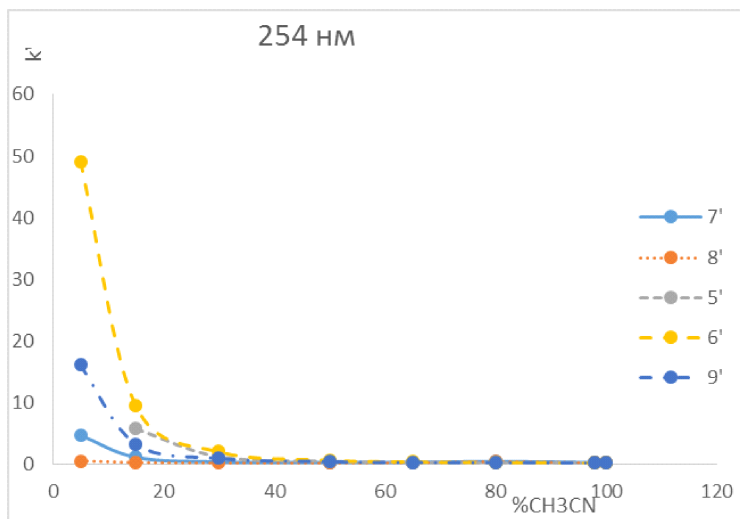


Рис.3. Залежність коефіцієнта ємності (k') гідразинокарбатіоамідів (5'-9') від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі за довжиною хвилі 254 нм

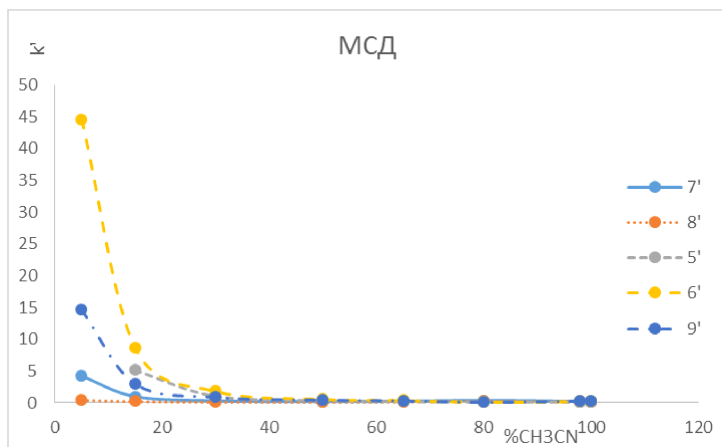


Рис.4. Залежність коефіцієнта ємності (k') гідразинокарбатіоамідів (5'-9') від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

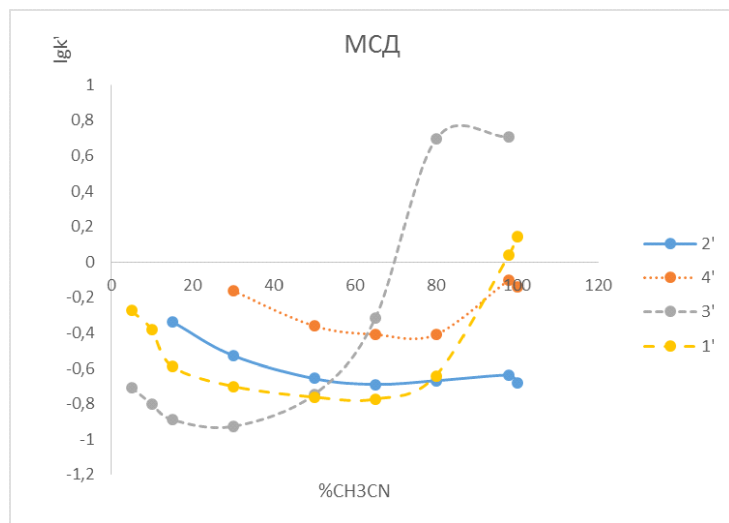


Рис.5. Залежність логарифму коефіцієнта ємності ($\lg k'$) гідразидів (1'-4') від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

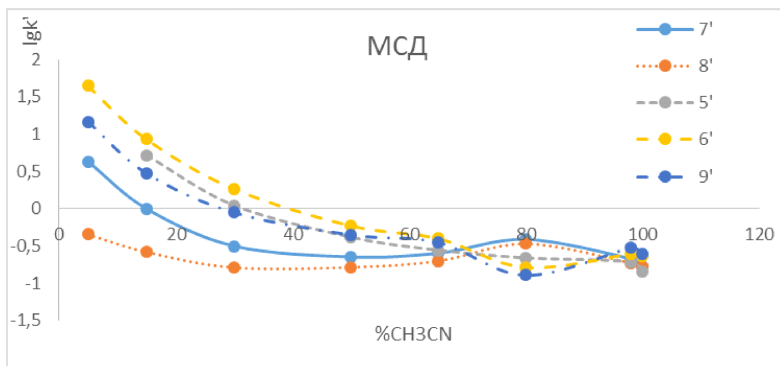


Рис.6. Залежність логарифму коефіцієнта ємності (lgk') гідразинокарбатоамідів (5'-9') від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

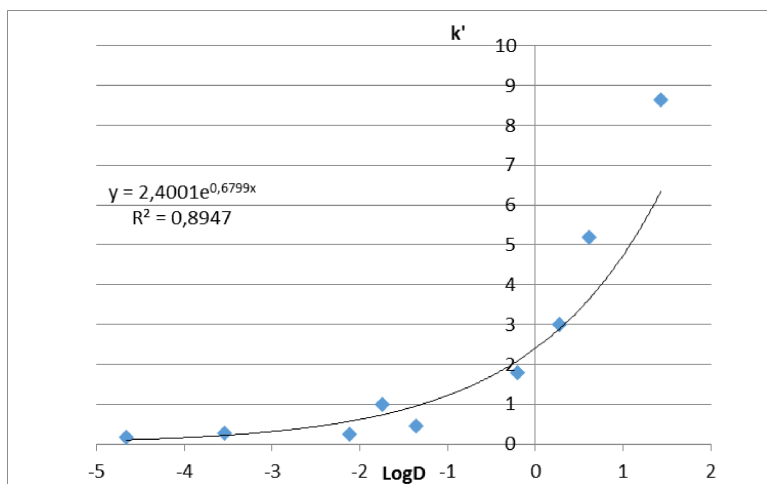
За допомогою програми ACDLabs 6 були розраховані значення $LogP$ (1). Найбільш гідрофобні молекули краще утримуються на обернено-фазовому сорбенті та краще розчиняються в октанолі ніж у воді. В ряду досліджуваних сполук спостерігається взаємозв'язок між коефіцієнтом ємності та $LogP$. Виключенням є сполуки 1 та 2, 5 та 8. Можна пояснити, що є значний вплив рН на співвідношення іонізованої та неіонізованої форми, внаслідок різних констант іонізації.

Для того щоб врахувати іонізацію сполук при різних рН були розраховані значення $LogD$ (2). Даний показник, з нашої точки зору, з більшою ніж $LogP$ достовірністю може бути використаний для характеристики утримання сполук, так як він враховує їх іоногенний характер. Дослідження по утриманню проводили при використанні кислотного буфера (форміатна кислота), для того щоб зменшити взаємодію нітрогенвмісних сполук з сіланольними групами. Буферний розчин містив 0,1% форміатної кислоти $pH=1/2pK_a-1/2lgC_a = S*3,75-1/2*lg0,0265=2,66H^*2,7$ (якщо вважати, що елюент складається тільки з води). Коефіцієнти ємності при цьому синхронно (експоненціальна залежність) змінюються з розрахованими значеннями $LogD$ (Рис.7). Взаємозв'язок lgk' та $logD$ носить лінійний характер.

Таблиця 2

Значення LogP, LogD та коефіцієнтів ємності k' при 15% CH₃CN (по мас-спектрометричному детектору)

№ сполуки	LogP	LogD при 2,7	k', 15%CH ₃ CN, МСД
1'	-0.89+/- 0.24	-2,12	0,257071
2'	-0.96+/- 0.26	-1,36	0,462121
3'	-1.71+/- 0.40	-4,66	0,158586
4'	0.25+/- 0.25	-0,2	1,80101
5'	1.27+/- 0.60	0,61	5,181818
6'	1.43+/- 0.61	1,43	8,641414
7'	0.81+/- 0.64	-1,75	0,999495
8'	-0.94+/- 0.64	-3,54	0,264141
9'	0.28+/- 0.60	0,27	2,993434

Рис. 7. Залежність коефіцієнта ємності k' (при 15% CH₃CN) від LogD

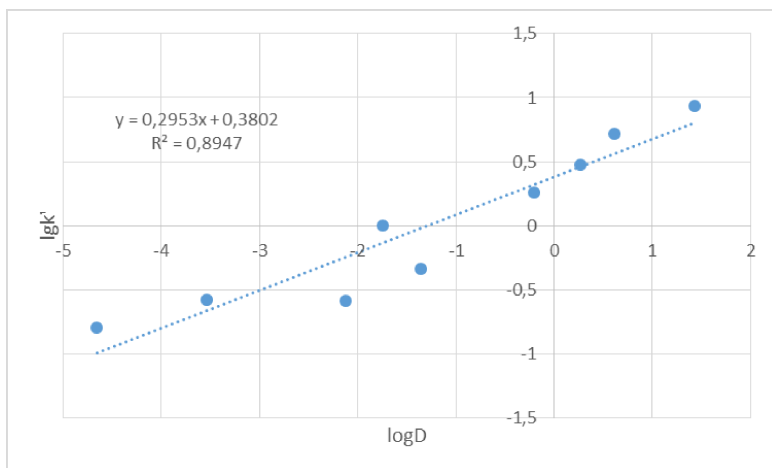


Рис. 8 Залежність логарифму коефіцієнта ємності (15% CH_3CN) від LogD

Висновки

1. Нами встановлено залежність коефіцієнта ємності k' від вмісту ацетонітрилу для гідразидів карбонових кислот та гідразінокарбатіоамідів, напівпродуктів в синтезі ряду солей 1,2,4-тіоацетатних кислот.

2. Для гідразидів спостерігається на початку обернено-фазовий механізм утримання), а потім (більше 80% ацетонітрилу) іоно-обмінний механізм взаємодії з сіланольними групами азотовмісних катіонів. В разі ж гідразінокарбатіоамідів ми бачимо виключно обернено-фазовий механізм утримання.

3. Встановлено взаємозв'язок між $\log P$, LogD та коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісту ацетонітрилу.

Література

1. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии.- Рига: Зинатне, 1988.- 390 с.

2. Reversed-phase HPLC retention data in correlation studies with lipophilicity molecular descriptors of carotenoids / Podunavac-Kuzmanovič Sanja O., Jevrič Lidija R., Teriž Aleksandra N., Љумиј Zdravko // Hem. Ind. - 2013– V. 67, N 6.-P. 933–940.

3. Progress in the use of HPLC for evaluation of lipophilicity / Nasal A., Kaliszan R // Curr. Comp.-Aided Drug Design.- 2006.- V.2.- P.327–340.

4. Fast $\log P$ determination by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with UV and mass spectrometry detections / Henchov

Yveline, Guillarme Davy, Martel Sophie et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V.394, N7. – P.1919-30.

5. Lipophilicity determination of highly lipophilic compounds by liquid chromatography / Guillot Amandine, Henchoz Yveline, Moccand Cyril et al. // *Chem. Biodiversity.* -2009. – V.6, N 11. - P.1828-36.

6. Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with *in silico* molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives / Perisic-Janjic Nada, Kaliszan Roman, Wiczling Pawez // *Mol. Pharm.* - 2011.- V.8, N 2. - P.555-63

7. Simultaneous determination of pKa and lipophilicity by gradient RP HPLC / Wiczling P., Struck-Lewicka W., Kubik J. et al. // *Anal. Chem.* – 2006. – V.78, N 1, P.239-49.

8. Estimating the Lipophilicity of Natural Products using a Polymeric Reversed Phase HPLC Method / Zheng Bo and West Lyndon M. // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2009. – V. 33, N 1. - V.118–132.

9. ElogPoc: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery / Lombardo Franco, Shalaeva Marina Y., Tupper Karl A. et al. // *J. Med. Chem.*-2000. – V.43. - P.2922-2928.

10. Determination of Lipophilicity of New Thiosemicarbazide and 1,2,4-triazole-3-thione Derivatives Using Reversed-Phase HPLC Method and Theoretical Calculation / Hawryl Anna, Kuźmierz Edyta, Hawryl Mirosław, Hwieboda Ryszard et al. // *J. Liq. Chrom. R. T.*-2015. – V.38. P. 430–437.

11. ElogDoct: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. 2. Basic and Neutral Compounds / Lombardo Franco, Shalaeva Marina Y., Tupper Karl A. Et al. // *J. Med. Chem.* – 2001. – V.44. – P.2490-2497.

12. Snyder L.R., Dolan J.W. High-Performance Gradient Elution The Practical Application Of The Linear-Solvent-Strength Model. - Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.- 461 c.

13. Simultaneous Analysis of Xanthone Glycosides in *Halenia elliptica* by HPLC–DAD–ESI–MS / Xia Liu, Yong Liu, Juan Chen, and Yan-Ping Shi. // *J. Chrom. Sci.* – 2010. - V. 48. - P. 76-80.

14. Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography / J.J. Baeza-Baeza, C. Ortiz-Bolsico, J.R. Torres-Lapasiy, M.C. Garcia-Blvarez-Coque // *J. Chrom. A.* - 2013. – V.1284. - P.28– 35

15. Prediction of log k_w using MCIS and LSER methods for heterocyclic nitrogen compounds / Hong Yang Li Li., Ding Yanbing, Wang Liansheng et al. // *J. Liq. Chrom R. T.* - 1999. – V.22, N 6. – P.897–907.

Резюме. Целью работы было исследование характеристик удерживания некоторых веществ, полупродуктов в синтезе солей 1,2,4-триазолтиоацетатных кислот с помощью ВЭЖХ-УФ-ЭСИ-МС. Колонка Zorbax SB-C18, 30 мм x 4.6 мм, 1.8 мкм. Установлена зависимость коэффициента емкости k' от содержания ацетонитрила для гидразидов карбоновых кислот и гидразинокарбатиоамидов. Установлена взаимосвязь между $\log P$, $\text{Log} D$ и коэффициентами емкости исследуемых соединений при 15% содержания ацетонитрила.

Ключевые слова: характеристики удерживания, гидразиды карбоновых кислот, гидразинокарбатиоамиды, ВЭЖХ-УФ-ЭСИ-МС.

Summary. The purpose was to study the retention characteristics of certain substances, intermediates in the synthesis of 1,2,4-triazolthioacetate salts by HPLC-UV-ESI-MS. Column Zorbax SB-C18, 30 mm x 4.6 mm, 1.8 μm . The dependence of the capacity factor k' on the content of acetonitrile for carboxylic acids hydrazides and hydrazinocarbothioamides. The relation between $\log P$, $\text{Log} D$ coefficients and capacity factors of the test compounds at 15% content of acetonitrile.

Keywords: retaining properties, carboxylic acid hydrazides, hydrazinocarbothioamides, HPLC-UV-ESI-MS.