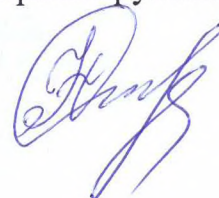


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ЭЛЕКТРОХИМИИ
ИМ. А.Н. ФРУМКИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Иванова Юлия Павловна

**Разделение, идентификация и прогнозирование сорбционного
поведения новых азотсодержащих гетероциклических соединений
в условиях жидкостной хромато-масс-спектрометрии**

1.4.4. – Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор
Буряк Алексей Константинович

Москва 2026

Оглавление

Список сокращений	5
Введение.....	6
Глава 1. Литературный обзор	16
1.1 Биологически активные азотсодержащие гетероциклические соединения	16
1.1.1 Фармакологическая активность производных 1,2,4-триазола	16
1.1.2. Лекарственные препараты на основе урацила	21
1.1.3 Применение аналогов пуриновых нуклеозидов в медицине	25
Выводы по разделу 1.1.....	28
1.2 Хроматографические и масс-спектрометрические методы исследования азотсодержащих гетероциклических соединений.....	29
1.2.1 Хроматография как метод исследования сложных объектов.....	29
1.2.2 Сорбенты, используемые в обращённо-фазовом режиме ВЭЖХ	32
1.2.3 Хромато-масс-спектрометрия азотсодержащих гетероциклических соединений.....	37
1.2.4 Применение ВЭЖХ-МС/МС в анализе производных 1,2,4-триазола.....	40
1.2.5 Анализ производных аналогов нуклеозидов методом ВЭЖХ-МС/МС	42
Выводы по разделу 1.2.....	44
1.3 Квантово-химические методы для описания влияния структуры соединений на физико-химические и биологические свойства	44
1.3.1 Общая характеристика квантово-химических методов	44
1.3.2 Моделирование свойств молекул азотсодержащих гетероциклов по структурным параметрам	49
Выводы по разделу 1.3.....	54
Выводы по Главе 1	55
Глава 2. Экспериментальная часть.....	56
2.1 Объекты исследования	56
2.1.1 Производные 1,2,4-триазола	56
2.1.2 Производные урацила.....	57
2.1.3 Флексимерные производные пуриновых оснований	60
2.1.4 Дополнительные реактивы для хроматографического анализа..	61
2.1.5 Растворители.....	62

2.2 Оборудование	62
2.2.1 Жидкостная хроматография.....	62
2.2.2 Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением	63
2.2.3 Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией	64
2.2.4 Квантово-химическое моделирование структур азотсодержащих гетероциклов.....	65
2.2.5 Расчёт термодинамических характеристик сорбции производных 1,2,4-триазола.....	67
2.2.6 Молекулярно-статистический расчёт констант Генри адсорбции производных 1,2,4-триазола.....	68
Глава 3. Обсуждение результатов	71
3.1 Квантово-химическое и молекулярно-статистическое моделирование для описания структуры азотсодержащих гетероциклических соединений	71
3.1.1 Расчёт физико-химических параметров молекул азотсодержащих гетероциклов.....	71
3.1.2 Вычисление топологических параметров производных урацила.....	75
3.1.3 Расчёт термодинамических характеристик производных 1,2,4-триазола молекулярно-статистическим методом	78
Выводы по разделу 3.1.....	82
3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография азотсодержащих гетероциклических соединений.....	82
3.2.1 Адсорбция производных 1,2,4-триазола в условиях обращённо-фазовой жидкостной хроматографии.....	82
3.2.2 Адсорбция производных урацила в условиях обращённо-фазовой жидкостной хроматографии.....	88
3.2.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография флексимерных производных пиридина и пиримидина	91
3.2.4 Построение корреляционных зависимостей между хроматографическими и расчетными физико-химическими параметрами молекул производных урацила и флексимерных производных пиримидина.....	95
Выводы по разделу 3.2.....	98
3.3 Масс-спектрометрия исследуемых гетероциклических соединений	100
3.3.1 Выбор метода обнаружения и идентификации азотсодержащих гетероциклов.....	100

3.3.2 Фрагментация флексимерных производных пиридина и пиримидина в условиях тандемной масс-спектрометрии.....	101
3.3.3 Определение мест протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина квантово-химическими методами	107
3.3.4 Определение новых пиридиновых стильбенов методом ВЭЖХ- МС-ИЭР.....	111
3.3.5 Оценка возможности комплексообразования флексимерных производных пиримидина с катионами металлов в условиях МАЛДИ	113
Выводы по разделу 3.3.....	114
Заключение	115
Список литературы	118

Список сокращений

- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
- ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-тандемная масс спектрометрия
- ОДС – октадецилсиликагель
- ПГУ – пористый графитированный углерод
- ГТС – графитированная термическая сажа
- ЦПС - цианопропилсиликагель
- MRM – мониторинг множественных реакций
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- ТФП – теория функционала плотности (DFT – Denscity Functional Theory)
- ВЗМО – высшая занятая молекулярная орбиталь
- НСМО – низшая свободная молекулярная орбиталь
- GAFF – General AMBER Force Field (генерализованное силовое поле на базе программного обеспечения AMBER)
- ИЭР – ионизация в режиме электрораспыления
- ГХ-МС – газо-хромато-масс-спектрометрия
- CREST – Conformer–Rotamer Ensemble Sampling Tool
- MALDI-TOF MS – времяпролётная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Поиск новых лекарственных препаратов и разработка методик их синтеза и анализа является важной задачей современной науки, так как существует множество примеров адаптации патогенных микроорганизмов к имеющимся медикаментозным средствам снижения их активности или подавления жизнедеятельности. Развитие методов диагностики и исследования механизмов лечения различных заболеваний также нуждаются в подборе препаратов, имеющих в своём составе действующие вещества с определёнными заданными биологическими или физико-химическими свойствами. В связи с этим особое значение приобретают методы качественного и количественного анализа не только синтезируемых соединений, но и выделяемых из биологических объектов их метаболитов. Применяемые средства исследования должны обладать достаточной чувствительностью, эффективностью и экспрессностью, при этом обеспечивать надёжную идентификацию определяемых лекарственных соединений как на стадии их синтеза и очистки, так и при оценке фармакокинетики и фармакодинамики по образующимся метаболитам. Подобным сочетанием качеств обладают физико-химические методы, зарекомендовавшие себя не только в области химии, но и в междисциплинарных исследованиях.

Наибольшее распространение среди таких методов получила высокоэффективная жидкостная хроматография в комбинации с масс-спектрометрическим детектированием в тандемном режиме. Хроматография – это высокоинформативный инструмент анализа, позволяющий получать данные о влиянии структурных параметров соединений на их физико-химические характеристики, приводящие к пониманию реализуемых в различных системах межмолекулярных взаимодействий. На основании этого удаётся разрабатывать эффективные методики разделения изомерных соединений, а привлечение квантово-химических методов способствует развитию прогностических моделей, необходимых для оптимизации условий эксперимента. Важным этапом

является выбор сорбентов, которые за счёт определённых межмолекулярных взаимодействий обеспечат различия в скорости элюирования молекул, тем самым обеспечив высокую селективность разделения. Метод масс-спектрометрии позволяет установить молекулярную массу соединений, а исследование спектров ионизации, полученных в тандемном режиме, помогает в определении их структурной формулы (особенно в сочетании с данными других физико-химических методов, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса и инфракрасная спектроскопия). Получение информации о структурной формуле молекул является важным аспектом в установлении связи между их строением и физико-химическими, биологическими и сорбционными характеристиками, что особенно актуально при прогнозировании свойств по структуре не синтезированных ранее веществ. Такой подход направлен на совершенствование гибридных методик исследования, разделения и идентификации комплексными хромато-масс-спектрометрическими методами.

Гетероциклические соединения на основе азота прекрасно проявили себя в качестве средств лекарственной терапии, направленной против вирусов, грибов и бактерий. Структура данного класса органических веществ легко поддаётся разнообразным модификациям, в результате которых могут быть привиты к циклу различные заместители, кардинальным образом изменяющие свойства молекул. Среди известных на сегодняшний день медикаментозных средств большой популярностью пользуются препараты на основе пяти- и шестичленных азотсодержащих гетероциклов, такие как триазолы, пиридины, пиримидины и др. По этой причине в качестве объектов исследования были выбраны производные 1,2,4-триазола, урацила и флексимерные производные пиридина, пиримидина, пиррола и пиразола, в которых пяти- и шестичленные гетероциклы связаны через гибкую углерод-углеродную связь. Бесконтрольное применение пациентами антибиотиков, а также естественные мутации вирусов и бактерий, приводят к появлению у последних резистентности к имеющимся лекарствам, однако изменение состава и структуры действующих веществ, содержащих азотистые гетероциклические фрагменты, позволяет добиться требуемой терапии.

Последние исследования в области иммунологии, направленные на выявление связи между действием фермента человеческой пуриновой нуклеозидфосфорилазы (*hPNP*) и появлением некоторых аутоиммунных и онкологических заболеваний, привели к открытию веществ-ингибиторов данного фермента. Их практическое применение обусловлено плановыми хирургическими вмешательствами при трансплантологии, когда появляется необходимость искусственного подавления иммунитета с целью предотвращения отторжения организмом-реципиентом чужеродных донорских клеток. В качестве таких ингибиторов могут применяться аналоги пуриновых оснований и нуклеозидов с очень гибкой структурой, такие как флексимерные производные пиридина и пиримидина.

Поскольку в процессе синтеза целевых соединений в качестве побочных продуктов реакции могут образовываться вещества, близкие по структуре, но не имеющие требуемой биологической активности, то большое внимание следует уделять подбору аналитической методики, направленной на идентификацию и эффективное разделение синтезируемых веществ. Методы жидкостной хроматографии являются в данном случае приоритетными, поскольку обладают возможностью добиваться высокой эффективности и селективности при правильной оптимизации условий и выборе подходящего сорбента. Однако задача идентификации структурно близких гетероциклических соединений с помощью методов масс-спектрометрии является довольно трудоёмкой, поскольку имеющиеся базы данных спектров, получаемых совместимыми с жидкостной хроматографией способами ионизации, зачастую невелики. К тому же, органические вещества обладают довольно сложным строением, так как образуют изомерные соединения (оптические, геометрические, конформационные), не позволяющие достоверно идентифицировать структурную формулу их молекул, поскольку результаты фрагментации изомеров приводят к получению схожих масс-спектров.

В связи с указанными трудностями большую популярность приобретают методы математического моделирования, направленные на установление корреляционных зависимостей между структурой органических соединений и их свойствами. Возможность прогнозирования сорбционного поведения органических соединений в условиях жидкостной

хроматографии позволила бы сократить время эксперимента и помочь в идентификации ранее не изученных веществ. Таким образом, результаты комплексного исследования азотсодержащих гетероциклов, включающего установление закономерностей адсорбции и фрагментации в зависимости от состава и строения молекул, могут быть полезны при разработке эффективных и надёжных аналитических методик качественного и количественного определения как на стадии производства, так и при изучении механизмов действия лекарственных препаратов на их основе.

Цели и задачи исследования

Цель работы заключалась в разработке наиболее эффективных методик разделения и идентификации хроматографическими и масс-спектрометрическими методами структурно близких азотсодержащих гетероциклических соединений, являющихся производными 1,2,4-триазола, пиридина и пиримидина и проявляющих биологическую активность, основанных на физико-химических представлениях о влиянии строения и положения заместителей на адсорбцию. Для достижения поставленной цели выполнены следующие задачи:

1. Изучить особенности сорбционного поведения азотсодержащих гетероциклов на поверхности различных сорбентов в условиях ОФ ВЭЖХ с применением квантово-химических методов характеристики структуры молекул.
2. Получить методом регрессионного анализа корреляционные уравнения, связывающие хроматографические параметры с физико-химическими, зависящими от структурной формулы гетероциклических соединений, и оценить возможность их применения при прогнозировании сорбционного поведения в условиях ОФ ВЭЖХ ранее не исследованных соединений.
3. Изучить закономерности фрагментации молекул производных пиридина и пиримидина при ионизации электрораспылением для поиска набора характеристических ионов, позволяющих ускорить процесс идентификации производных урацила и флексимерных производных пиридина и пиримидина с использованием метода тандемной масс-спектрометрии.

Провести квантово-химические вычисления наиболее устойчивых протонированных форм молекул для определения наиболее вероятных направлений фрагментации производных пиридина и пиримидина в условиях tandemной масс-спектрометрии.

Научная новизна

1. Методом ВЭЖХ на различных сорбентах исследована сорбция ряда производных 1,2,4-триазола, урацила и флексимерных производных пиридина и пиримидина, содержащих два различных гетероциклических фрагмента.
2. Разработана методика разделения структурно близких азотсодержащих гетероциклических соединений на поверхности пористого графитированного углерода с применением ВЭЖХ, а также охарактеризовано влияния заместителей на адсорбционное поведение.
3. С помощью методов квантово-химического моделирования и множественной линейной регрессии впервые получены корреляционные уравнения, описывающие взаимосвязь между физико-химическими параметрами и топологическими индексами производных урацила и флексимерных производных пиримидина, которые могут быть использованы для прогнозирования удерживания близких по структуре соединений из указанных рядов гетероциклов.
4. Методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения при ионизации электрораспылением получены наборы характеристических фрагментных ионов и определены их брутто-формулы для упрощения идентификации структурно близких производных пиридина, пиримидина.
5. С применением методов квантово-химического моделирования рассчитаны энергетические параметры и определены наиболее вероятные места протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина, необходимые для прогнозирования наиболее вероятных путей фрагментации.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в применении квантово-химических методов расчета и методов множественной линейной регрессии для решения задач целевого и нецелевого анализа сложных смесей.

Практическая значимость работы заключается в определении параметров удерживания ранее неизученных азотсодержащих гетероциклических соединений на различных типах сорбентов и получении набора характеристических фрагментных ионов, а также в разработке способов разделения и идентификации структурно близких гетероциклических соединений методом хромато-масс-спектрометрии.

Методология и методы исследования

Основными методами исследования в работе были высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектором и масс-спектрометрией высокого разрешения, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, молекулярно-статистическое моделирование и теория функционала плотности. Обработка экспериментально полученных результатов осуществлялась с применением программного обеспечения Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics, Германия). Квантово-химические расчеты физико-химических и энергетических параметров органических молекул гетероциклов проводились с использованием программного пакета *Spartan 14* для Windows (Wavefunction Inc., Ирвайн, Калифорния, США). Расчёт топологических индексов и молекулярных дескрипторов, описывающих структуру исследуемых азотсодержащих гетероциклов проводился с применением специального программного пакета *Mordred*, созданного коллективом исследователей из Японии на базе языка программирования *Python* и находящегося в свободном доступе в репозитории GitHub. С использованием автоматизированного квантово-химического протокола, основанного на методе локализации орбиталей Фостера-Бойса и реализованного в программном обеспечении *CREST* (находится в свободном доступе в репозитории GitHub), получена информация о наиболее вероятных местах протонирования молекул флексимерных производных

пиридина и пиримидина при ионизации электрораспылением. Молекулярно-статистические расчеты получены с помощью программного обеспечения, разработанного в лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии ИФХЭ РАН им. А.Н. Фрумкина.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты применения метода ВЭЖХ для определения хроматографического удерживания производных 1,2,4-триазола, пиридина и пиримидина на различных сорбентах (пористый графитированный углерод (ПГУ), цианопропилсиликагель (ЦПС), октадецилсиликагель (ОДС)).
2. Методика выбора параметров, необходимых для прогнозирования хроматографического поведения неизвестных соединений производных пиримидина на основе квантово-химических расчётов и метода множественной линейной регрессии.
3. Результаты масс-спектрометрического исследования фрагментации структурно близких флексимерных производных пиридина и пиримидина.
4. Результаты применения метода Фостера-Бойса для определения наиболее вероятных мест протонирования молекул производных пиридина и пиримидина при ионизации в газовой фазе.
5. Методика разделения и идентификации структурно близких производных 1,2,4-триазола, пиридина и пиримидина методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные результаты выполненной работы обладают высокой степенью достоверности, что обеспечивается использованием разнообразных современных инструментов, способов и приемов научного исследования, применением методов математической статистики для определения погрешности измерений, а также сопоставлением с теоретическими и экспериментальными результатами других работ.

Результаты оформлены в виде рецензируемых научных статей, получивших оценку специалистов в области физической химии, хроматографии, масс-спектрометрии и квантовой химии. Результаты работы прошли апробацию на научных конференциях и опубликованы в высокорейтинговых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на IV Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2023), 22-й Международной выставке лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо 2024» (Москва, 2024), XI Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2025), XX Конференции молодых ученых, аспирантов и студентов ИФХЭ РАН «Физикохимия-2026» (Москва, 2026), XII Международной конференции «Современные проблемы адсорбции», посвященной 125-летию академика М.М. Дубинина (Москва, 2026).

Работа выполнена в лаборатории «Физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии» Института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук.

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 публикации в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК:

1. Иванова, Ю. П. Экспериментальное и теоретическое определение сорбционных характеристик производных 1,2,4-триазола методом жидкостной хроматографии и молекулярно-статистическим моделированием / **Ю. П. Иванова**, А. К. Буряк // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2024. – Т. 24. – №5. – С. 620-630. Q4 (Scopus)
2. Иванова, Ю. П. Исследование сорбционного поведения флексимерных производных азотсодержащих гетероциклов различного строения на поверхности гиперкарба в условиях ВЭЖХ / **Ю. П. Иванова**, А. К. Буряк // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2026. – Т.26. – № 3. – С. 482-491. Q4 (Scopus)
3. Иванова, Ю. П. Моделирование адсорбции производных урацила на поверхности гиперкарба в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / **Ю. П. Иванова**, С. А.

Нуйкин, А. Н. Ставрианиди, А. К. Буряк, С. Н. Ланин, Н. П. Платонова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2026. – Т.26. – № 3. – С. 555-568. Q4 (Scopus)

4. Boronin, E. N. Photoorganocatalytic E→ Z isomerization of stilbenes in continuous-flow. Organic Chemistry Frontiers // E. N. Boronin, I. I. Vorobyov, A. A. Ushakova, K. A. Romanov, A. S. Bolshakov, Y. P. Ivanova, A. Ya. Freidzon, V. F. Otvagin, A. Yu. Fedorov, V. Hessel, T. Noël, A. V. Nyuchev. Organic Chemistry Frontiers. – 2026. Q1 (Scopus)

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 144 страницах, содержит 18 таблиц, 19 рисунков, состоит из введения, 3 глав, списка используемой литературы, включающего 206 источников.

Личный вклад автора

Автором с учетом рекомендаций научного руководителя сформулированы проблемы, поставлены цель и задачи, выбраны методы и объекты исследования. Автором выполнены работы по анализу теоретического материала по теме исследования, изучению методик проведению лабораторных исследований и вычислительных экспериментов, а также обобщены и интерпретированы полученные результаты, подготовлены публикации по результатам выполненной работы. Экспериментальные и расчетные данные, представленные в диссертации, получены лично автором и сотрудниками лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии и опубликованы в соавторстве с научным руководителем и сотрудниками, работавшими совместно с автором в процессе выполнения исследований.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность за предоставленные образцы производных 1,2,4-триазола профессору кафедры неорганической химии ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», д.х.н. Белоусовой З.П. Автор искренне благодарит сотрудников Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, ведущего научного сотрудника, д.х.н. Хандажинскую А.Л. и старшего научного сотрудника,

к.х.н. Матюгину Е.С. за производные урацила и флексимерные азотсодержащие гетероциклические соединения. Автор выражает глубокую благодарность за ценные рекомендации и советы всем коллегам, принимавшим участие в исследовании, за доброжелательное отношение и поддержку, а также лаборатории «умных» методов химического анализа под руководством к.х.н. Шолоховой А.Ю.

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки (соглашение о предоставлении гранта № 075-15-2024-534).

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Биологически активные азотсодержащие гетероциклические соединения

1.1.1 Фармакологическая активность производных 1,2,4-триазола

Органические соединения, содержащие в составе гетероциклический фрагмент 1,2,4-триазола, обладают широким спектром биологической активности. В первую очередь такие соединения проявляют противогрибковую (антимикотическую) активность, антимикробную [1–3], противотуберкулёзную [4], противосудорожную [5], анальгетическую [6], противовирусную [7]. Также производные 1,2,4-триазола используются при лечении онкологических [8,9], кардиологических заболеваний [10–12], входят в состав ноотропных [13,14], нейропротекторных [15] и противодиабетических [16] препаратов.

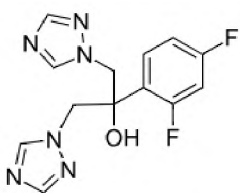
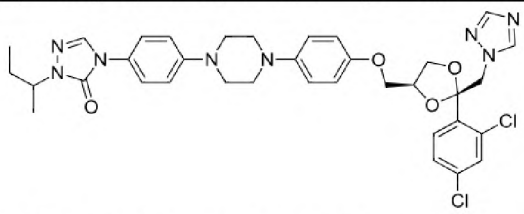
Триазольный гетероцикл является 6 π -ароматической электронной системой, проявляющей основные свойства. В структуре кольца присутствуют два типа атомов азота: один содержит свободную электронную пару на *p*-орбитали, второй – в плоскости кольца [17]. Такое асимметричное распределение электронов приводит к делокализации π -электронной системы, что определяет реакционную способность производных триазола, а также их биологическую активность. Триазол-содержащий фрагмент устойчив к метаболизму и склонен к образованию водородных связей, что влияет на способность молекул растворяться в воде и органических растворителях и влияет на связывание с биомолекулярными мишенями. Триазолы могут быть использованы в качестве связующих звеньев для соединения двух фармакофоров, что способно существенно повысить биологическую активность и биодоступность препарата [18,19]. Введение в структуру алкильных цепей либо ароматических заместителей, особенно содержащих атом галогенов, существенно повышает антимикробную активность соединений. При сравнении с препаратами на основе имидазола – пятичленного гетероцикла с двумя атомами азота, производные триазола обладают более выраженной специфичностью к

целевому белку, что способствует росту эффективности таких средств и расширению спектра действия.

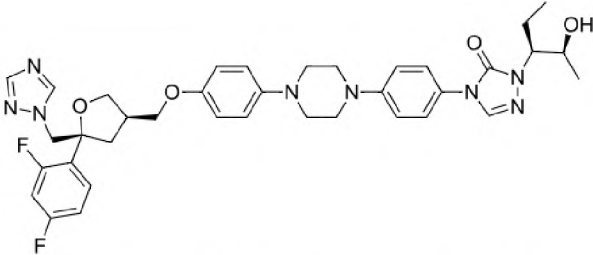
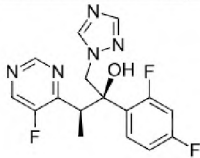
Принцип действия всех противогрибковых азолов (триазолов, имидазолов, тиазолов) основан на ингибировании ферментов группы цитохрома Р450 (СYP), например, 14-альфа-деметилазы (СYP51), или за счёт связывания свободного атома азота в циклическом фрагменте с железом простетической группы гема в активном центре фермента [20]. Высокие значения липофильности, характерные для соединений на основе азолов, приводят к снижению их эффективности при пероральном приёме вследствие ускоренной метаболической деградации. Преодолеть данную проблему удалось при изменении способа введения препарата в организм, например, использовать их в качестве средств местной терапии (мази, суппозитории).

По сравнению с имидазолами, производные 1,2,4-триазола обладают более выраженной антимикотической активностью [21,22]. К числу наиболее распространённых средств данной фармакологической группы препаратов относится флуконазол (табл. 1.1), содержащий два гетероциклических фрагмента, которые не экранированы заместителями.

Таблица 1.1. Действующие вещества некоторых наиболее распространённых противогрибковых препаратов на основе 1,2,4-триазола

Название препарата	Структурная формула и название по ИЮПАК
Флуконазол	 2-(2,4-дифторфенил)-1,3-бис(1H-1,2,4-триазол-1-ил)-2-пропанол
Итраконазол	 4-[4-[4-[4-[[2-(2,4-Дихлорфенил)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]фенил]-1-пиперазинил]фенил]-2,4-дигидро-2-(1-метилпропил)-3H-1,2,4-триазол-3-он

Продолжение таблицы 1.1

Позаконазол	 4-(4-(4-(4-(((3R,5R)-5-(2,4-Дифторфенил)-5-(1,2,4-триазол-1-илметил)оксолан-3-ил)метокси)фенил)пиперазин-1-ил)фенил)-2-((2S,3S)-2-гидроксипентан-3-ил)-1,2,4-триазол-3-он
Вориконазол	 (альфаR,бетаS)-альфа-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-альфа-(2,4-дифторфенил)-бета-метил-бета-(5-фтор-4-пиримидинил)этанол

Такое строение молекулы позволяет данному соединению более прочно связываться с ферментом, блокируя превращение ланостерола в эргостерол, необходимый для построения клеточной мембраны грибов (рис. 1.1) [23]. Вследствие нехватки эргостерола происходит накопление токсичных метилстеролов и нарушается проницаемость и целостность клеточной стенки грибов. В конечном итоге клетки грибов теряют способность к репликации и росту, а затем умирают [24].

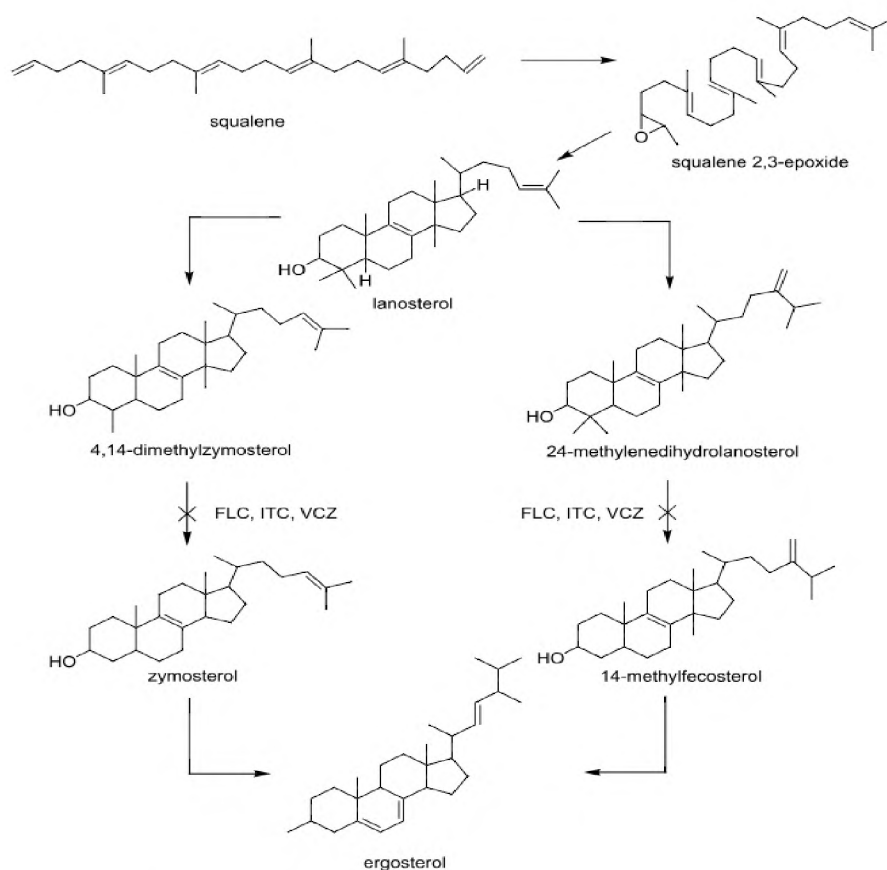


Рисунок 1.1 – Стадии биосинтеза эргостерола, на которых происходит ингибирование фермента производными 1,2,4-триазола: флуконазолом (FLC), итраконазолом (ITC), вориконазолом (VCZ).

При пероральном приёме флуконазол мигрирует в плазме крови в свободной форме и выводится почками в неизменном виде, не образуя метаболитов в печени. Результаты исследований показывают, что данное производное 1,2,4-триазола благодаря свойству липофильности может вводиться внутривенно, а также способно проникать через гематоэнцефалический барьер. Это позволяет лечить тяжёлые гнойные поражения нервной системы, вызванные, например, грибами рода *Candida spp.* или *Aspergillus spp.* Более выраженный терапевтический эффект в отношении последнего рода грибов проявляет итраконазол и его гидроксильный аналог позаконазол (табл. 1.1) [25,26]. Позаконазол лучше усваивается при одновременном приёме жиров и образует метаболиты в печени, однако 77% препарата выводятся из организма в неметаболизированном виде.

К данной группе препаратов также относится вориконазол (табл. 1.1) – синтетическое производное флуконазола с расширенным спектром действия. Вориконазол обладает более выраженной ингибирующей активностью в отношении фермента 14-альфа-стеролдеметилазы, в то время как у флуконазола доля ингибирования фермента составляет 44% [27]. Высокую эффективность вориконазол проявляет против дрожжевых, нитевидных и диморфных плесневых грибов. Против зигомикетов вориконазол практически неактивен, поэтому у пациентов с ослабленным иммунитетом наблюдались случаи прорывного зигомикоза [28–30]. Также в литературе отмечается, что чувствительность к грибам рода *Aspergillus spp.* у вориконазола выше, чем у итраконазола [31]. Однако исследования фармакокинетики и фармакодинамики показали, что препарат обладает сложным и интенсивным метаболизмом, а также более выраженными побочными действиями, поэтому необходим строгий контроль за дозировкой принимаемого лекарства [32,33].

Антимикотические свойства производных триазола находят своё применение не только в медицине, но и в сельском хозяйстве [34–36]. Они используются в ветеринарной практике и в качестве фунгицидов для борьбы с вредителями растений [37–45]. Однако чрезмерное использование азолов приводит к возникновению резистентности (устойчивости) к данным антимикотикам, следовательно, потребность медицины в разработке и синтезе новых препаратов растёт.

Помимо биологической активности, триазолы используются в качестве заменителей воды в протонных проводниках топливных элементов. В безводных условиях легирование мембран триазолами позволяет улучшить их проводящую способность благодаря возможности гетероциклов выступать в роли как доноров, так и акцепторов протонов. Для предотвращения вымывания из мембран легирующих агентов, необходимо иммобилизовать малые молекулы, например, полимерными материалами. Так, 4,5-дициано-1H-1,2,3-триазол (DCTz) в составе композита с полиакрилонитрилом показал проводимость порядка 1 См/см в сухих условиях при 100°C [46,47].

Таким образом, производные триазолов, в частности 1,2,4-триазола, нашли широкое применение в медицинской химии благодаря разнообразию

проявляемой биологической активности. Однако, проявляя различную фармакокинетику и токсичность, они наиболее эффективны в противогрибковой терапии.

1.1.2. Лекарственные препараты на основе урацила

Биодоступность азотсодержащих гетероциклических соединений объясняется не только их реакционной способностью, но и тем, что они присутствуют в живых организмах и являются активными участниками различных биохимических процессов. Например, азотистые основания, входящие в состав РНК и ДНК, являются главным строительным материалом любого организма. Тимин и урацил – нуклеосахариды из группы кислородсодержащих производных пиримидина, также играют важную роль в нормальном функционировании и развитии нервной системы, поскольку нарушения пуринового обмена могут приводить к психическим и нейродегенеративным расстройствам [48,49]. Нуклеосахариды обладают различными биологическими свойствами в зависимости от заместителей, например, противовирусными [50] и антибактериальными [51]. Противовирусная активность производных урацила основана на ингибировании стадий пути репликации вирусов, что позволило разрабатывать препараты для лечения вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитов В и С, вируса герпеса [52]. Однако в последние годы всё большее развитие получают разработки, направленные на создание высокоэффективных и малотоксичных для пациентов противораковых препаратов [53,54].

Рак является следствием аномально быстрого роста опухолевых клеток организма, поэтому перед химиками-синтетиками остро стоит задача создания препаратов, обладающих достаточной селективностью, эффективностью и адресной доставкой [55]. Производные урацила оказались весьма успешными кандидатами в качестве средств лекарственной терапии различных онкологических линий [56]. В настоящее время 5-фторурацил применяется для лечения широкого спектра онкологических заболеваний в гинекологии (рак молочной железы и яичников), гастроэнтерологии (рак желудка и поджелудочной железы),

проктологии (колоректальный рак) и др. Разработка новых производных урацила, заключающаяся в изменении структуры заместителей и их положения в местах пиримидинового кольца, позволила существенно расширить список препаратов для борьбы с онкологией и избегать химиорезистентности клеток, возникающей в следствии быстрых мутаций.

Механизм действия противораковых препаратов основан на блокировании определённых ферментов, необходимых для синтеза и репликации ДНК раковых клеток. Фермент тимидилатсинтаза катализирует процессы синтеза ДНК, в связи с чем он и стал мишенью в химиотерапии онкологии [57]. Данный фермент блокируется 5-фтордезоксинуридинмонофосфатом, который может быть получен путём биохимических превращений из 5-фторурацила [58]. Применение 5-фторурацила позволило добиться высоких терапевтических показателей в отношении рака головы и шеи, желудка и яичников, однако вследствие возникающих мутаций клеток рака молочной железы у некоторых пациентов возникает резистентность к действию данного соединения [59]. В связи с этим были приняты попытки синтезировать новые производные урацила и его аналоги, которые могли бы быть перспективными кандидатами для снижения цитотоксической активности онкологических клеток. Так, например, соединения УД-1 (гептил-4-(3-(4-фторбензил)-1-метил-2,6-диоксогексагидропиримидин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат), УД-2 (октил-4-(3-(4-фторбензил)-1-метил-2,6-диоксогексагидропиримидин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат) и УД-4 (1-(4-фторбензил)-3-метил-6-(пиперидин-1-ил)дигидропиримидин-2,4(1H,3H)-дион) с применением метода колориметрической оценки метаболической жизнеспособности и чувствительности к препаратам клеток (МТТ-тест) продемонстрировали высокую дозозависимую эффективность в отношении клеток рака молочной железы MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 и мышинной линии MCF-4T1 [60].

В практике лечения онкологических заболеваний успешно применяются и другие препараты на основе урацила, например 5-фтор-1-(тетрагидро-2-фуранил)-2,4(1H,3H)-пиримидиндион (тегафур) [61]. В организме данное соединение под действием ферментов тимидин- и уридинфосфорилазы гидролизуетсся с образованием 5-фторурацила,

действие которого было описано ранее. Постепенный метаболизм тегафура позволяет избежать распада 5-фторурацила в желудочно-кишечном тракте, что обеспечивает более стабильную концентрацию действующего препарата в крови. Приём тегафура также позволяет избежать необходимости внутривенного введения 5-фторурацила, которое можно проводить только в стационарных условиях, и получать пациентам амбулаторную терапию.

Для лечения колоректального рака, метастазирующего в печень, хорошо зарекомендовал себя препарат флоксуридин (5-фтор-2'-дезоксифлуоридин). Действие вещества также направлено на нарушение процесса синтеза ДНК онкологических клеток. Однако при длительном приёме у пациентов возникает резистентность к флоксуридину вследствие снижения активности ферментов тимидинкиназы и оротатфорибозилтрансферазы, участвующих в биохимических превращениях препарата [62]. Совместное применение флоксуридина с тетрагидроуридином (5-фтор-2'-дезоксифлуоридин) приводит к повышению терапевтического эффекта, в том числе и при лечении запущенных опухолей большого размера [63]. Тетрагидроуридин под действием ферментов фосфорилируется и, включаясь в ДНК, в конечном итоге ингибирует ДНК-метилтрансферазу, что останавливает рост раковых клеток.

Также производные урацила проявляют противовирусное и противомикробное действие, обусловленное нарушением этапов репликации вирусов и бактерий. Как аналоги нуклеозидов, производные урацила участвуют в различных биологических процессах, однако многие нуклеозидные препараты подвержены метаболическому распаду. Модификация структуры молекул за счёт введения различных заместителей способствует улучшению фармакокинетики и абсорбции препаратов, а также снижению токсического эффекта 5-фторурацила, возникающего при непосредственном его приёме.

Известный как противораковый препарат, флоксуридин также способен проявлять антибактериальную активность против *Streptococcus suis* – зоонозного патогена, вызывающего менингит и сепсис у людей и свиней, зачастую приводящие к летальному исходу [64,65]. Неправильное и

чрезмерное применение антибиотиков приводит к появлению устойчивости у различных бактерий, в том числе и у *Streptococcus suis* [66]. Действие флоксуридина в данном случае направлено на уничтожении бактерий вследствие нарушения проницаемости клеточной мембраны [67]. Кроме этого, препарат снижает вирулентность *Streptococcus suis* за счёт экспрессии соответствующих генов.

В общем случае противовирусная и антибактериальная активность производных урацила связана с нарушением ключевых этапов репликации вирусов и роста клеток бактерий. Такой терапевтический эффект был обнаружен в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловируса (ЦМВ), вирусов герпеса, стафилококка, кишечной палочки, псевдомонад (например, синегнойной палочки) и кишечной палочки [68–73].

По данным всемирной организации здравоохранения на конец 2024 года в мире насчитывалось около 41 миллиона человек, заражённых ВИЧ-инфекцией, причём 65% от общего числа людей проживают в Африке [74]. ВИЧ – это вирус, который поражает лейкоциты и ослабляет иммунную систему организма. В результате пациенты становятся более восприимчивы к различным инфекциям и некоторым видам рака. Цитомегаловирус является одним из наиболее распространённых копатогенов ВИЧ, поэтому задача разработки препаратов двойного действия, подавляющих оба патогена, весьма актуальна. Гетеродимеры молекул исходных препаратов обеспечивают медленное высвобождение активных соединений, что снижает токсическое воздействие лекарства по сравнению с их комбинацией [74]. Так, на основе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы азидотимидина (3'-азидо-3'-дезокситимидин) и ламивудина (4-амино-1-[(2R,5S)-2-(гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил]-1,2-дигидропиримидин-2-он) были синтезированы гетеродимеры, проявившие различную биологическую активность в отношении ВИЧ и цитомегаловируса [75].

1.1.3 Применение аналогов пуриновых нуклеозидов в медицине

Пурины – азотсодержащие гетероциклические соединения, для которых характерно наличие конденсированных пиримидинового и имидазольного колец [76]. Структура пуринов является основой для синтеза многих биологически значимых соединений, таких как аденин, гуанин, ксантин, гипоксантин, кофеин, мочевая кислота. Аденин и гуанин входят в состав ДНК, РНК и АТФ-систем, необходимых для протекания биологических процессов. Пурины являются компонентами нуклеиновых кислот и участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, а также в процессах передачи сигналов и действуют как нейромедиаторы [77]. Таким образом, пуриновые соединения являются важными объектами в регуляции метаболизма всех живых организмов, а их производные могут быть использованы для разработки медицинских препаратов различного назначения.

На основании пуриновых соединений разработаны лекарства с противовирусной (вирус простого герпеса, ВИЧ) [78,79], антибактериальной (например, *Helicobacter pylori*, вызывающий хронический гастрит) [80–82], противораковой (в отношении рецепторов фактора роста определённых клеток) [83–85], противотуберкулёзной активностью, а также препараты для лечения болезни Альцгеймера [86]. Биологическая активность производных пурина определяется их способностью нарушать процедуру синтеза нуклеиновых кислот, необходимых для роста и репликации патогенных клеток. Также лекарственные аналоги нуклеозидов в процессе биосинтеза фосфорилируются, затем активируются киназами и ингибируют действие внутриклеточных ферментов (полимераз, рибонуклеотидредуктаз и др.) [87]. Процедура подавления действия внутриклеточного АТФ является одной из ключевых при разработке противораковых препаратов, а производные пуринов демонстрируют возможность образования до трёх водородных связей внутри сайтов АТФ. Такая конкуренция с метаболитами раковых клеток приводит к апоптозу (программируемой гибели) последних.

Важным для иммунной системы человека является фермент человеческой пуриновой нуклеозидфосфорилазы (*hPNP*), участвующий в

утилизации пуринов в организме. Его недостаток приводит к развитию различных аутоиммунных (псориаз, ревматоидный артрит, лимфома, рассеянный склероз) и онкологических заболеваний (Т-клеточный лейкоз). Однако при кратковременном ингибировании действия данного фермента удаётся принудительно снизить функцию естественного иммунного ответа организма, что особенно важно в до- и послеоперационном периоде при трансплантации органов, что позволяет подавить отторжение чужеродных клеток [88]. Действие противовирусных и антибактериальных препаратов нуклеозидного типа значительно усиливается при совместном приёме с ингибиторами *hPNP* [89].

При исследовании кристаллической структуры и строения фермента пуриновой нуклеозидфосфорилазы установлено, что для разработки эффективных ингибиторов фермента необходимо использовать структурно-ориентированный дизайн. Были получены четыре структурно различных поколения аналогов переходного состояния [90].

Противораковая эффективность пуриновых соединений также связана с их способностью подавления синтеза нуклеиновых кислот благодаря связыванию с необходимыми для этого ферментами. Например, синтезированный на основе пуринов второго поколения клофарабин ингибирует фермент рибонуклеозидредуктазу, тем самым останавливает рост цепей ДНК раковых клеток [83].

На цитотоксичность производных пуринов оказывают значительное влияние строение и положение заместителей. Полат и др. показали, что при замещении различными фенильными группами в положении С-8 пурина изменяется биологическая активность соединений [91]. Введение трифторметилфенила, 4-метоксифенила и 4-фторфенила позволило добиться значений концентрации полумаксимального ингибирования соединений $IC_{50} < 10$ мкМ в отношении клеточных линий печени (Нuh7).

Исследование различных фармакофорных характеристик одобренных препаратов на основе азотсодержащих гетероциклов позволило разработать гибридные молекулы. Так, производные пиразоло[3,4-d]пиримидинов действуют как гибкие каркасы, которые могут быть связаны с такими фармакофорами, как фталимид, тиомочевина, оксидазол, гидразон, образуя эффективные ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста путём

связывания с тирозинкиназой [92]. Например, индолил-пиримидиновые гибриды, например, N-(2-(3,4-дихлорфенил)-4-оксотиазолидин-3-ил)-4-(1H-индол-3-ил)-6-метил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоксамид продемонстрировал наиболее выраженную антипролиферативность *in vitro* в отношении различных клеточных линий (HepG2, MCF-7, HCT-116), чем известные ранее эрлотиниб и 5-фторурацил [93].

Производные 2,9-дизамещенных 8-фенилтио/фенилсульфинил-9H-пуринов, синтезированные группой Хейя продемонстрировали цитотоксичность *in vivo* в отношении клеточных линий HCC827 у бесшёрстных мышей ($IC_{50}=1,9$ нМ), а ингибирование EGFR L858R/T790M/C797S со значением $IC_{50}=114$ нМ [94]. Тризамещённые производные пурина (производные 3-(2,6,9-тризамещенного-9H-пурина)-8-халкона) проявили противораковую активность в отношении клеток рака желудка MGC803, а наибольшую эффективность показало соединение **60** с значением концентрации полумаксимального ингибирования $IC_{50}=0,84$ мкМ [95]. Эксперимент показал, что достижение высоко терапевтического эффекта помогают заместители, содержащие ароматические фрагменты, увеличивающие π -сопряжённую систему линкеров.

Модификация аналогов нуклеозидов путём сшивки двух различных фрагментов, например, соединение N-(1-((5-((1,3-диметил-2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрагидро-7H-пурин-7-ил)метил)-1,3,4-оксидазол-2-ил)метил)-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил)ацетамид, синтезированное в четыре стадии из 1,3-диметил-3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-диона и урацила (рис. 1.2) также приводит к получению более эффективных лекарственных средств [96].

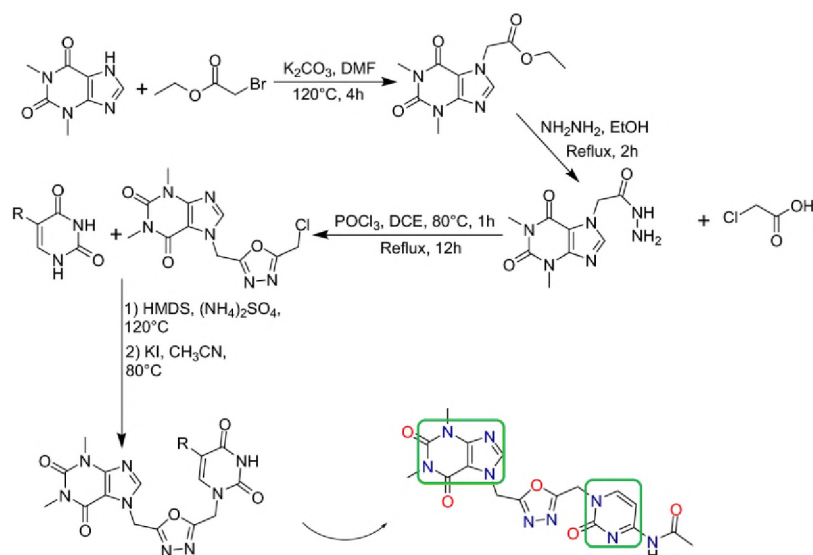


Рис. 1.2 – Стадии синтеза N-(1-((5-((1,3-диметил-2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрагидро-7Н-пурин-7-ил)метил)-1,3,4-оксидазол-2-ил)метил)-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил)ацетамида

Введение урацилового фрагмента позволило получить соединение с широким спектром действия. Авторами продемонстрировано заметное ингибирование роста нескольких линий раковых клеток: рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231), лёгких (A-549), фибросаркомы (HT-1080 со значением $IC_{50}=17,08\pm0,97$ мкМ). Действие данного соединения основано на его способности активировать фермент каспазу 3/7 за счёт образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий внутри активного центра фермента.

Выводы по разделу 1.1

Производные азотсодержащих гетероциклических соединений, содержащие в составе фрагменты 1,2,4-триазола, урацила, а также являющиеся синтетическими аналогами нуклеозидов, успешно применяются в качестве препаратов для лечения широкого спектра заболеваний.

Среди противогрибковых препаратов лидирующие позиции занимают производные 1,2,4-триазола. Многие препараты ряда азолов десятилетиями используются в медицине, однако периодическая модификация структуры, не затрагивающая существенным образом гетероциклический фрагмент,

позволяет бороться с резистентностью, проявляемой у некоторых пациентов к известным лекарствам из-за мутаций микроорганизмов.

Успешное лечение различных форм онкологических заболеваний оказалось возможным благодаря использованию синтетических аналогов нуклеозидов (в том числе и производных урацила). Препараты данной группы азотистых гетероциклов структурно близки к соединениям, участвующим в естественных процессах биосинтеза организма. Благодаря этому, синтетические производные пуриновых оснований способны встраиваться в процедуру биосинтеза ферментов, необходимых для репликации патогенных ДНК и РНК раковых клеток, вызывая их гибель. Однако, несмотря на успехи химиков-синтетиков, задача синтеза новых соединений с различными заместителями (фармакоформными группами) по-прежнему остаётся актуальной для медицины.

1.2 Хроматографические и масс-спектрометрические методы исследования азотсодержащих гетероциклических соединений

1.2.1 Хроматография как метод исследования сложных объектов

Хроматография является одним из самых современных и передовых методов исследования объектов окружающей среды, который не может рассматриваться только как аналитический. Термин «хроматография» сочетает в себе несколько понятий, которые позволяют характеризовать её как *науку* о межмолекулярных взаимодействиях и транспорте молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся друг относительно друга фаз, *процесс* дифференциального многократного перераспределения частиц между этими фазами, а также *метод* разделения компонентов сложных смесей, основанный на различных скоростях их перемещения [97].

В основе данных понятий лежит представление о хроматографической системе, которое подразумевает наличие двух несмешивающихся между собой фаз с развитой границей раздела (поверхностью), а также третьего компонента, который способен за счёт действия различных межмолекулярных сил обратимо мигрировать из объёмной фазы к поверхности второй. Одна из указанных фаз является

стационарной (неподвижной), а другая – подвижной, выполняя в первую очередь транспортную функцию. По агрегатному состоянию последней фазы хроматографию можно разделить на газовую, жидкостную и сверхкритическую флюидную. Химическая природа и геометрическая структура неподвижной фазы определяют действие тормозящих сил, конкурирующих с влиянием подвижной фазы, обеспечивающей движение растворённых в ней компонентов. Одной из главных таких тормозящих сил является сорбция – процесс концентрирования вещества на межфазной границе (*адсорбция*) или поглощение его объёмом (*абсорбция*) [98]. Участники хроматографической системы в данном случае будут называться сорбент – неподвижная фаза, элюент – подвижная фаза, сорбат – растворённое в элюенте исследуемое соединение.

Хроматография является динамическим процессом, в котором сорбат за счёт сорбционных сил мигрирует из объёма элюента к поверхности сорбента, а через некоторое время обратно возвращается в поток, а скорость таких перемещений определяется реализуемыми межмолекулярными взаимодействиями в системах сорбат – сорбент, сорбат – элюент, сорбент – элюент. В вариантах газовой хроматографии последним типом взаимодействий пренебрегают, поскольку подвижная фаза представлена в виде инертного газа и выполняет только транспортную функцию. Практическое применение данного метода к тому же ограничено физико-химическими свойствами анализируемых соединений: они должны быть летучими при нагревании и термически стабильными. Жидкостная хроматография при этом является более функциональным методом, поскольку анализируемые соединения должны быть растворимы и обратимо сорбируемы. Однако при этом элюент становится активным участником хроматографического процесса, оказывая влияние на удерживание и разделение компонентов смеси.

В середине 60-х годов XX века венгерско-американским учёным Чабба Хорватом был сконструирован первый жидкостный хроматограф высокого давления, положивший начало методу «high performance liquid chromatography» (HPLC), в переводе с английского «высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)». В последующие два десятилетия бурно развивалось приборостроение, появились автосамплеры – блоки

автоматического серийного ввода проб, а также произошло внедрение компьютерной техники. Современное технологическое оснащение существенно расширило исследовательские возможности, обеспечив высокие качество анализа и точность регистрационных методов.

По механизму взаимодействия компонентов хроматографического процесса жидкостная хроматография подразделяется на несколько видов:

1. *Адсорбционная*. Сорбент – твёрдое тело, как правило пористое. Разделение соединений обусловлено различиями констант адсорбции.

2. *Распределительная*. Сорбент – твёрдый носитель с нанесённой на поверхность жидкой фазой. Разделение веществ связано с различием в коэффициентах распределения между элюентом

3. *Ионообменная*. Адсорбция ионов, содержащихся в элюенте, обусловлена электростатическими взаимодействиями разноимённо заряженных ионов.

4. *Эксклюзионная (ситовая)*. Сорбент – пористое тело или гель (вариант гель-проникающей хроматографии). На удерживание влияет способность молекулы проникать в поры. Разделение зависит от геометрических размеров молекул.

5. *Аффинная*. Разделение компонентов смесей биологически активных соединений происходит вследствие их биоспецифического взаимодействия с комплементарными группами сорбента (лигандами).

Адсорбционная хроматография подразделяется по относительной полярности элюента на нормально-фазовую (НФ) и обращённо-фазовую (ОФ). В НФ ВЭЖХ элюентом является смесь неполярного растворителя с модифицирующей добавкой, а сорбент – полярный, например, силикагель или оксид алюминия. В ОФ режиме наоборот: полярный (водно-органический) элюент и неполярный сорбент (силикагель с привитыми алкильными группами, пористый графитированный углерод и др.).

Удерживание сорбатов на поверхности сорбента в режиме ОФ ВЭЖХ определяется действием неспецифических дисперсионных, а также электростатических индукционных взаимодействий, и характеризуется конкретными физико-химическими свойствами молекул (липофильностью и поляризуемостью). Присутствие различных функциональных групп в структуре молекул сорбата, а также пространственное расположение

заместителей способствуют появлению диполь-дипольных взаимодействий и/или водородных связей с молекулами растворителя, что, в свою очередь, повлияет на силу связывания адсорбата с поверхностью сорбента.

1.2.2 Сорбенты, используемые в обращённо-фазовом режиме ВЭЖХ

Одним из наиболее популярных сорбентов, используемых в аналитической ОФ ВЭЖХ, является октадецилсиликагель (ОДС). Синтезируют ОДС путём химической прививки алкильных (C18) групп к поверхности силикагеля по связям $-\text{Si}-\text{C}-$ [99,100]. Плотность прививки органической фазы в значительной степени зависит от способа получения сорбента и может варьироваться при использовании специальных методов от 25 до 30% в пересчете на углерод [101]. Степень покрытия поверхности модификатором лежит в диапазоне примерно 10 – 70%, в лучших случаях – 95%. Использование хроматографических колонок, заполненных ОДС, обусловлено рядом преимуществ, среди которых его неподверженность набуханию, высокая скорость установления сорбционного равновесия, способность к лёгкой обратимой сорбции компонентов при изменении состава элюента [102,103]. Удерживание молекул на ОДС возможно за счёт их адсорбции молекул на внешней поверхности алкильных групп, в объеме привитого слоя, либо при их взаимодействии с остаточными силанольными группами поверхности ОДС (рис. 1.3) [98].

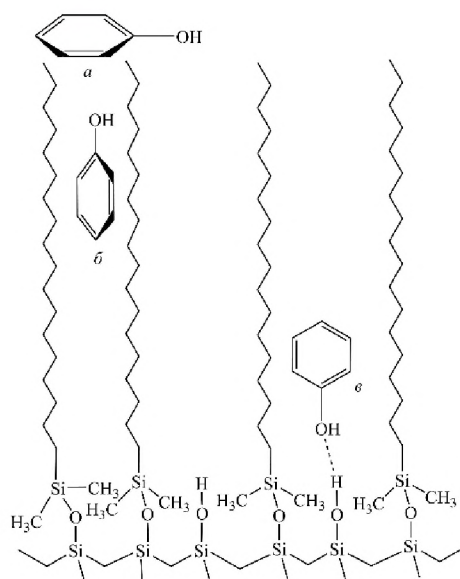


Рис. 1.3 Примеры взаимодействия сорбтата (фенола) с фазой ОДС:

- а) адсорбция на внешней поверхности привитого слоя; б) адсорбция в объеме поверхностного слоя; в) сорбция за счёт взаимодействия с остаточными силанольными группами

Большой популярностью в хроматографическом анализе пользуются колонки, заполненные частицами силикагеля с привитыми цианопропильными группами. Они синтезируются аналогичным образом путём прививки к поверхностным силанольным группам силикагеля цианопропильной фазы. Образующийся цианопропилсиликагель (ЦПС) является универсальным и может быть использован в гидрофильном, нормально- и обращённо-фазовом режимах элюирования. Механизм удерживания в режиме ОФ ВЭЖХ основан на гидрофобных взаимодействиях, возникающих за счёт пропильного радикала. При этом сила гидрофобного взаимодействия у такого сорбента ниже по сравнению с октадецилсиликагелем по причине малой длины углеводородной цепи, а удерживание полярных соединений на поверхности неподвижной фазы осуществляется за счёт взаимодействий с циано-группой.

В 1979 году Ноксом и Гилбертом был разработан новый процесс синтеза углеродного сорбента, который продемонстрировал хорошую механическую стабильность и довольно высокую хроматографическую производительность и воспроизводимость результатов – пористого графитированного углерода (гиперкарб) [104]. Суть данного метода синтеза состоит в пропитывании мезопористого силикагеля для ВЭЖХ

фенолформальдегидным олигомером с дальнейшей карбонизацией в потоке инертного газа при 1000 °С и последующем растворением силикагельного темплата в щелочном растворе, в результате чего был получен «пористый стеклоуглерод», содержащий микропоры и отличающийся низкой эффективностью в ВЭЖХ. Однако последующий обжиг при двух – трёхкратном повышении температуры (обжиге) из структуры материала удаляются микропоры и происходит его графитизация [105]. При изменении параметров исходной силикагельной матрицы можно синтезировать углеродный сорбент с определенными размерами и формой пор, а также моделировать необходимые поверхностные свойства, тем самым влияя на его сорбционные характеристики в условиях хроматографии.

В настоящее время самый популярный сорбент на основе пористого графитированного углерода выпускается компанией Thermo Scientific (ранее Thermo Electron Corporation) под торговым наименованием «Hypercarb». Сорбенты для таких колонок также получают путём карбонизации, однако имеется ряд отличий от условий первоначальной методики синтеза. В качестве матрицы также используют силикагель, пропитывая его гомогенной смесью фенола и уротропина, а затем, с целью увеличения скорости полимеризации, постепенно нагревают до 80-160°C, что помогает добиться более упорядоченной полимерной структуры и обеспечить более полное проведение процесса карбонизации. Далее полимер подвергают пиролизу в инертной атмосфере азота при 1000°C, получая высокопористый аморфный углерод. Силикагельную матрицу растворяют в горячем водном растворе калия, затем осуществляют графитирование путём термической обработки при 2340°C в инертной атмосфере аргона. В результате происходит структурная перегруппировка и закрытие микропор. После охлаждения до 1000°C проводят дезактивацию поверхности в токе водорода, делая её более однородной за счёт взаимодействия молекул водорода с остаточными свободными радикалами, присутствующими на углеродной поверхности.

Гиперкарб разительно отличается от других сорбентов, используемых в ОФ ВЭЖХ, в частности от ОДС, благодаря отсутствию каких-либо функциональных групп. Структура ПГУ представляет собой проводящий электричество кристаллический материал, состоящий из переплетенных

между собой графитовых лент, чередующихся сложным образом. Сами графитовые слои состоят из гексагонально расположенных sp^2 -гибридизованных атомов углерода, соединяемых ковалентными связями и удерживающихся за счет ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Такое строение обеспечивает высокую жесткость и механическую устойчивость данной матрицы (рис. 1.4) [106]. Также авторы работы приводят снимок структуры кристаллитов гиперкарба, полученный методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМВР) (рис. 1.5). По данным снимка авторы рассчитали, что каждый кристаллит построен примерно из 30 графитовых листов, расстояние между которыми составляет примерно 3.30 – 3.40 Å.

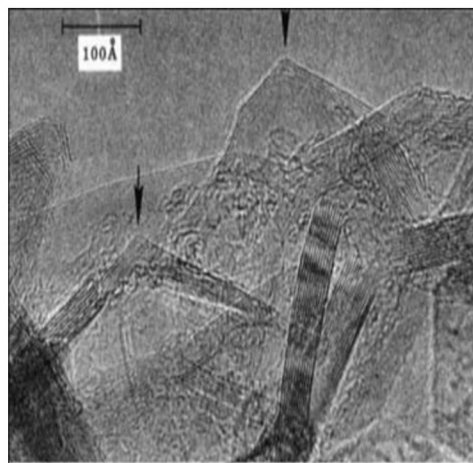
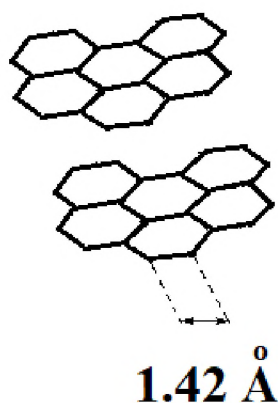


Рис. 1.4 Структурная формула Рис.1.7 ПЭМВР-снимок углеродных графитовых слоёв гиперкарба кристаллитов гиперкарба [106] [100]

Гиперкарб относится к «двумерным» графитам, поскольку для него не характерно регулярное чередование положений плоскостей слоёв. В то же время его структура похожа на структуру графитированной термической сажи (ГТС), однако связь кристаллитов прочнее за счёт возникающих между ними слабых дисперсионных сил.

По механизму действия ПГУ относится к сорбентам для ОФ ВЭЖХ, однако вклад в удерживание вносят делокализованные π -электроны графита и высокая поляризуемость углерода, в результате чего возможно проявление сильных дисперсионных взаимодействий. Кроме того, удерживание на ПГУ также определяется гидрофобными взаимодействиями

в водно-органических растворах, приводящими к выталкиванию сорбатов из подвижной фазы. Наличие и тип поляризованных функциональных групп в молекулах аналитов несомненно будет сказываться на росте энергии межмолекулярного взаимодействия. В то же время более плоские структуры способны к более тесному прилеганию к поверхности сорбента благодаря большому числу контактов, что способствует росту параметров хроматографического удерживания в сравнении с молекулами, обладающими объёмными заместителями. Иными словами, существует некий стерический фактор, который также оказывает влияние на разделение, что особенно актуально для структурных аналогов [107].

Ввиду особенностей строения гиперкарб более гидрофобен по сравнению с типичными обращённо-фазовыми сорбентами, поэтому при взаимодействии с адсорбируемыми молекулами существенную роль играют индукционные взаимодействия с переносом заряда между графитовой поверхностью и полярными заместителями сорбатов. Данное явление получило название «эффект полярного удерживания» и обусловлено тем, что поверхность ПГУ в зависимости от полярности элюента, может выступать в качестве донора или акцептора электронов [107].

Также дополнительный вклад в удерживание на поверхности ПГУ вносят специфические π - π -взаимодействия с π -орбиталями кратных связей в молекулах органических соединений и делокализованной π -электронной системой поверхности ПГУ.

Резюмируя вышесказанное, можно констатировать, что механизм сорбции на гиперкарбе включает влияние двух типов взаимодействий: гидрофобных и дисперсионных, последние из которых состоят как из взаимодействия поверхности ПГУ с молекулами сорбатов, так и взаимодействия в результате поляризации. Таким образом, данный углеродный сорбент способен к проявлению высокой селективности при разделении ароматических и других сопряженных систем, различных ионных и полярных соединений.

1.2.3 Хромато-масс-спектрометрия азотсодержащих гетероциклических соединений

Поскольку азотсодержащие гетероциклы входят в состав многих лекарственных препаратов, то они являются и компонентами их метаболитов [108]. Физико-химические свойства гетероциклических соединений зависят от строения кольца, числа атомов азота, структуры и положения заместителей, а также способности молекулы выступать в роли донора или акцептора протонов [109,110]. Поэтому при выборе способа и методики анализа необходимо учитывать полярность соединения, кислотно-основные свойства, растворимость и устойчивость в растворе. Эти параметры влияют на извлечение вещества из биологической пробы, его разделение и регистрацию аналитического сигнала.

Для первичной идентификации и контроля чистоты применяют спектроскопические методы. Ультрафиолетовая и видимая спектрофотометрия подходит для анализа соединений, содержащих хромофорные группы и поглощающих свет в измеряемом диапазоне длин волн [111–113]. Метод спектрофотометрии также применяется и для количественного определения при наличии подходящего стандарта и отсутствии мешающих компонентов. Инфракрасная спектроскопия помогает установить наличие характерных функциональных групп, а ядерный магнитный резонанс — уточнить структуру вещества и расположение заместителей [114]. Однако для сложных смесей, например, плазмы или мочи, этих методов часто недостаточно: компоненты могут перекрываться по сигналам, а концентрация аналита — быть слишком низкой [114–116].

Повышение эффективности анализа достигается с помощью методов разделения компонентов сложной смеси, таких как хроматографические.

Газовая хроматография применяется для исследования летучих и термически устойчивых веществ. Если анализируемое соединение обладает низкой летучестью или разрушается при нагревании, метод может потребовать предварительной химической модификации, например, дериватизации [117,118]. Однако для большинства лекарственных гетероциклических соединений на практике используют жидкостную

хроматографию, поскольку она позволяет разделять полярные и термолabile соединения без перевода их в летучую форму [119,120]. Капиллярный электрофорез также применяют для разделения ионизируемых веществ: движение аналитов в электрическом поле зависит от заряда и размера молекул [121,122]. Метод может быть полезен для сильно полярных соединений, но его чувствительность и воспроизводимость зависят от состава буфера и условий подготовки пробы.

В жидкостной хроматографии компоненты смеси разделяются за счёт различий в их взаимодействии с неподвижной и подвижной фазами. Для фармацевтических соединений широко применяют обращённо-фазовый режим ВЭЖХ с колонками, заполненными модифицированным октадецильными (C18-) или октильными (C8-) группами силикагелем [122,123]. Удерживание молекул азотсодержащих гетероциклов на поверхности сорбента зависит не только от его гидрофобности, но и от степени ионизации. Поэтому состав элюента, его кислотность и концентрация органического растворителя подбираются с учётом свойств конкретного соединения. УФ-детектор удобен для количественного анализа веществ с достаточным поглощением, тогда как флуориметрический детектор применим к соединениям с собственной флуоресценцией или после получения флуоресцентного производного [124].

Сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрией высокого разрешения особенно востребовано при анализе лекарственных средств и биологических образцов, поскольку комбинация данных методов позволяет решить задачи разделения и идентификации компонентов смеси [125–127]. В тандемной масс-спектрометрии выбранный ион-прекурсор подвергается фрагментации, что приводит к образованию ионов-продуктов, позволяющих идентифицировать соединение за счёт сведений о структуре соединений. Для количественного анализа часто используют режим мониторинга множественных реакций (MRM) на тройном квадрупольном масс-спектрометре [128–130].

При идентификации метаболитов сравнивают точную массу и характер фрагментации предполагаемого продукта превращения с данными для исходного вещества, а при наличии — со стандартным образцом. Изменения массы могут указывать на типичные реакции

биотрансформации, например, окисление, восстановление, гидролиз или присоединение полярной группы. При этом данных только об одной молекулярной массе соединения недостаточно для однозначного подтверждения структуры: важны также результаты хроматографического удерживания, спектры фрагментных ионов и, по возможности, анализ стандарта. В биологических матрицах дополнительно оценивают влияние сопутствующих веществ на ионизацию, поскольку матричный эффект способен изменять отклик масс-спектрометра и смещать количественный результат.

Независимо от выбранного метода анализа, любая методика проверяется на пригодность по отношению к конкретной задаче. Для количественного анализа оценивают селективность, линейность, точность, прецизионность, пределы обнаружения и количественного определения, а также устойчивость аналита при хранении и подготовке пробы. При работе с плазмой, мочой или тканевыми экстрактами важны эффективность извлечения и матричный эффект. Эти характеристики определяют, можно ли надёжно применять метод для контроля качества лекарственного препарата, фармакокинетического исследования или поиска метаболитов.

Помимо классических задач разделения и идентификации компонентов смесей, жидкостная хроматография применяется и для изучения различных физико-химических параметров молекул. Так, например, получены данные о константах кислотности (pK_a) определяющих ионную форму лекарственного средства в растворе. Использование обращённо-фазового варианта ВЭЖХ позволило авторам получить результаты, обладающие хорошей воспроизводимостью и высокой точностью [131]. Объектами исследования были выбраны лекарственные соединения на основе имидазола (климбазол, ланоконазол, бифоназол, бутконазол, окиконазол, сертаконазол). В качестве сорбента использовался цианопропилсиликагель (Pinnacle DB Cyano, параметры колонки 250×4,6 мм, диаметр частиц сорбента 5 мкм, Restek, США), поскольку он обеспечивает более высокую селективность разделения и хорошую симметрию пиков по сравнению с колонками, заполненными фазами C8 и ОДС. Установлено, что по мере роста численных значений pH растворов наблюдалось увеличение времени удерживания

гетероциклических соединений при элюировании водно-ацетонитрильными растворами. Такое поведение связано с депротонированием основного атома азота в имидазольном цикле. Определённые в исследовании значения pK_a для производных имидазола находились в диапазоне от 5,75 до 6,31. Из полученных результатов можно сделать вывод, что исследованные препараты при желудочном pH присутствуют преимущественно в ионизированной форме, вследствие чего ограничена их пассивная проницаемость. При кишечном pH (6,0-7,5) преобладает содержание депротонированной формы гетероциклов в растворе, следовательно, повышается их биодоступность за счёт абсорбции через клеточные мембраны.

1.2.4 Применение ВЭЖХ-МС/МС в анализе производных 1,2,4-триазола

Выбор хроматографических условий зависит от строения конкретных производных: заместители влияют на полярность, растворимость, степень ионизации и удерживание. Поэтому универсальной методики для всех соединений с 1,2,4-триазольным кольцом нет. Многие лекарственные азолы, включая флуконазол и вориконазол, хорошо регистрируются методом тандемной масс-спектрометрии, однако их поведение при разделении определяется всей структурой молекулы, а не только наличием триазольной группы [132].

Анализ умеренно полярных производных триазола обычно начинают проводить в режиме обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке, заполненной октадецилсиликагелем (размер колонки около $100 \times 2,1$ мм с диаметром частиц 1,7–3,5 мкм) [133]. Если соединения удерживаются слишком слабо либо требуется разделить близкие по строению аналиты, проверяют фенильную или пентафторфенильную неподвижную фазу: такие сорбенты могут обеспечить лучшую селективность за счёт взаимодействий с ароматическими фрагментами.

В качестве элюента, используемого с ОДС, применяется смесь воды и органического растворителя (например, ацетонитрил, изопропиловый спирт) с летучей добавкой, например 0,1% муравьиной кислоты или 2–5 мМ

формиата аммония [134]. При масс-спектрометрическом детектировании сигналов наиболее предпочтительный вариант модификации элюента заключается в использовании летучих компонентов, поскольку фосфатные буферы и другие нелетучие соли могут загрязнять источник и подавлять аналитический сигнал. Кислотность элюента подбирают с учётом свойств аналита: кислая среда часто способствует регистрации основных соединений в режиме положительной ионизации в режиме электрораспыления, но может повлиять на их удерживание. Замена ацетонитрила на спирт (метанол или изопропанол) может способствовать улучшению селективности разделения или формы пиков.

Для метода разработки можно использовать градиент, начинающийся примерно с 5–10% ацетонитрила, с последующим повышением доли органической фазы до 90–95%. Например, градиент длительностью 6–10 минут, короткая промывка колонки и стадия повторного уравнивания колонки позволяют оценить удерживание и разделение смеси. Температуру колонки обычно поддерживают в диапазоне около 30–40 °C, а расход элюента выбирают с учётом геометрических характеристик колонок и источника масс-спектрометра. Однако описываемые условия эксперимента могут применяться лишь для первичного скрининга, а в случае решения задачи разделения структурно близких изомеров может потребоваться более пологий градиент, увеличение длины колонки или другой сорбент.

Высоко полярные производные и свободный 1,2,4-триазол могут слабо удерживаться на ОДС [135]. В таких случаях рассматривают гидрофильную хроматографию (HILIC) с полярной неподвижной фазой и подвижной фазой на основе ацетонитрила с небольшой долей водного раствора летучего буфера. Обычно разделение начинают при высокой доле ацетонитрила, затем постепенно увеличивают долю водной фазы. HILIC может улучшить удерживание полярных соединений, но требует тщательного уравнивания колонки и проверки совместимости состава пробы с начальным элюентом. Альтернативой для ионизируемых аналитов может быть смешанный режим, сочетающий гидрофобные и ионообменные взаимодействия.

В режиме тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) для многих лекарственных производных триазола на начальном этапе проверяют

положительную ионизацию в режиме электрораспыления и возможность образования протонированного иона состава $[M+H]^+$. Для количественного анализа на тройном квадруполе обычно используют метод мониторинга множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring, MRM), но переходы и энергию столкновений необходимо подбирать для каждого аналита отдельно по спектру продуктов распада. В том случае, когда вещества дают плохой отклик в положительном режиме, используют режим регистрации отрицательных ионов [136,137]. Температуру источника, напряжение и параметры газа оптимизируют на конкретном приборе, так как перенос настроек между системами без проверки может изменить чувствительность и интенсивность сигналов пиков.

При анализе плазмы, мочи или других биологических образцов хроматографическое разделение оценивают вместе с матричным эффектом. Белки часто удаляют осаждением органическим растворителем, применяют твердофазную экстракцию для очистки от примесей и концентрирования целевых компонентов, в том числе смешанно-режимные сорбенты, если свойства аналита это позволяют [138]. Также для количественного анализа предпочтительным является использование изотопно-меченых внутренних стандартов. Отдельно оценивается разделение структурно близких веществ и возможных интерферентов, поскольку совпадение масс-спектрометрического перехода само по себе не всегда обеспечивает их различие и достоверную идентификацию.

1.2.5 Анализ производных аналогов нуклеозидов методом ВЭЖХ-МС/МС

Условия анализа производных урацила также, как и в случае с производными 1,2,4-триазола, выбирают с учётом полярности и строения исследуемых соединений. Незамещённый урацил и некоторые его полярные производные слабо удерживаются на обычных ОДС колонках. Более гидрофобные вещества, например, соединения с алкильными или ароматическими заместителями, обычно разделяются на C18- или C8-силикагелях, поэтому при разработке методики сначала оценивают

удерживание анализита и состав смеси, а затем подбирают тип неподвижной фазы [139].

Для полярных производных подходят колонки для гидрофильной хроматографии, например, с амидной, аминной или цвиттерионной фазой [140–142]. Также можно испытывать пористый графитированный углерод: он обеспечивает иной механизм удерживания и может улучшить разделение близких по структуре веществ [143,144]. Определение удерживания более липофильных производных урацила осуществляют с применением ОДС в качестве сорбента, в том числе полярно-модифицированного.

Для колонок диаметром 2,1 мм в качестве начальных условий устанавливают расход подвижной фазы в диапазоне около 0,2–0,4 мл/мин и температуру колонки 25–40°C. Программу градиента выбирают так, чтобы она обеспечивала достаточное удерживание пиков полярных соединений, элюируемых в числе первых, и разделение структурно близких производных.

Для регистрации производных урацила используют tandemную масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением. Направление ионизации — положительное или отрицательное — подбирают экспериментально: оно зависит от заместителей и кислотно-основных свойств анализита. Для количественного анализа на тройном квадруполе обычно применяют режим MRM. При анализе биологических проб важны не только разделение, но и влияние матрицы на ионизацию [145].

Лекарственные препараты на основе урацила авторам работы [146] удалось успешно количественно определить методом ВЭЖХ-МС в плазме крови человека. Предварительная жидкостно-жидкостная экстракция смесью этилацетата и изопропанола в соотношении 10/1 (об./об.) с последующим выпариванием в 0,1% муравьиной кислоте позволяет быстро избавиться от мешающих макромолекул (компонентов плазмы). Для разделения использовали хроматографическую колонку, заполненную ОДС, а элюирование компонентов анализируемых проб осуществляли смесью буферного раствора ацетата аммония с муравьиной кислотой и метанолом. Идентификацию лекарственных соединений осуществляли с использованием метода мониторинга множественных реакций (MRM).

В режиме ОФ ВЭЖХ прекрасно проявил себя в качестве селективного сорбента ПГУ, позволивший авторам осуществить одновременное количественное определение урацила, дигидроурацила, тимина и дигидротимина [147]. Однако основная часть литературных данных, описывающих хроматографические методики анализа производных нуклеозидов основана на применении алкилсиликагельных сорбентов. При этом возможности использования ПГУ для эффективного разделения производных аналогов нуклеозидов, а также описание механизмов взаимодействия молекул гетероциклов с данным сорбентом, практически не обсуждаются.

Выводы по разделу 1.2

Хромато-масс-спектрометрия является эффективным и высокоинформативным методом исследования различных соединений. При помощи хроматографии удаётся разделить компоненты, находящиеся в сложных смесях, в том числе биологических. Методы масс-спектрометрии, в свою очередь, позволяют осуществлять регистрацию и идентификацию даже не разделённых компонентов смеси.

Для анализа гетероциклических соединений используются различные хроматографические системы, однако большинство из них основаны на применении алкилсиликагельных сорбентов, в частности, ОДС. Использование колонок, заполненных ПГУ, целесообразно при разделении полярных и структурно близких соединений (изомеров), которые на ОДС не удерживаются.

1.3 Квантово-химические методы для описания влияния структуры соединений на физико-химические и биологические свойства

1.3.1 Общая характеристика квантово-химических методов

В настоящее время квантово-химические вычисления обрели колоссальную популярность среди различных инструментов исследования химических систем. Применение вычислительных методов не только

позволяет дополнить экспериментальные результаты, но и получить данные об электронной структуре молекул, находящихся в равновесном или динамическом состояниях, физико-химических свойствах, энергетических и термодинамических параметрах молекул и сложных систем, практическое определение которых затруднено или невозможно. Фундаментальные методы квантовой химии разработаны в начале XX века, однако доступность и возможность их широкого применения стала доступна лишь с развитием компьютерных технологий: оборудования и целого спектра программных алгоритмов [148].

В основе квантово-химических расчётов лежит понятие об электронной структуре молекул и точное решение стационарного уравнения Шрёдингера [149]:

$$\hat{H}\psi_n = E_n\psi_n, \quad (1)$$

где $\hat{H}$ – оператор Гамильтона (гамильтониан), получаемый из функции Гамильтона (полной энергии, определяемой как сумма потенциальной и кинетической энергий для одной частицы); E_n – собственное значение энергии; ψ_n – волновая функция, являющаяся собственной функцией оператора Гамильтона; n – число электронов в системе.

Волновая функция ψ в приближении Борна-Оппенгеймера явно зависит от $3n$ координат всех n электронов системы (быстрое движение), а также неявно от координат ядер атомов (медленное движение) [150]. Значения молекулярной энергии параметрически зависят от положений ядер атомов, следовательно, E_n определяет поверхность потенциальной энергии (ППЭ) молекулы. Оператор Гамильтона $\hat{H}$ определяется из кинетической и потенциальной (типы взаимодействий: электрон-ядерное притяжение, электрон-электронное и ядер-ядерное отталкивание) энергий.

Получаемые дифференциальные стационарные уравнения в частных производных с $3n$ неизвестными не решаемы с позиции точности, поэтому необходимо введение некоторых приближений. Первое приближение основано на необходимости решения связанных, но более простых систем уравнений, то есть функция $3n$ переменных сводится к числу n функций (орбиталям), зависящим от трёх переменных. Таким образом, каждая молекулярная орбиталь (МО) будет характеризовать распределение

вероятностей одного электрона и определяться движением электрона в среднем поле остальных электронов [151]. Второе приближение связано с разложением неизвестных дифференциальных функций молекулярных орбиталей на конечное число линейных уравнений – базис атомных орбиталей (АО). Базисные функции АО являются гауссовыми или линейными комбинациями гауссовых функций, что позволяет рассчитать все необходимые матричные элементы.

На первом приближении основывается метод Хартри-Фока – квантово-химический метод среднего поля, который применим к многоэлектронной задаче (самосогласованное поле). В этом методе вместо волновой функции многоэлектронной системы в виде произведения одноэлектронных бесспиновых функций используется детерминант Слэтера. Метод Хартри-Фока относится к семейству неэмпирических квантово-химических методов (*ab initio*), в рамках которого решение уравнения Шрёдингера достигается математически без задействования каких-либо экспериментальных параметров, за исключением фундаментальных физических констант.

Полуэмпирические методы (*Semi-empirical*) позволяют решать упрощённые уравнения квантовой механики, при этом часть сложных математических интегралов либо отбрасывается, либо заменяется на параметры, полученные экспериментальными методами. Такое решение позволяет существенно сократить вычислительное время для многоатомных полимерных и биомолекул. Дополнительное преимущество у полуэмпирических методов перед методами *ab initio* заключается в точности получаемых результатов, поскольку необходимость сложных математических вычислений заменяется использованием определённого набора экспериментальных данных [148]. В общем случае полуэмпирические методы можно разделить на две группы. Первая группа учитывает только π -электроны системы (применимы для строго плоских молекул), вторая – все валентные электроны. Наиболее информативными являются расчёты, выполненные группой методов, учитывающей все валентные электроны системы σ - и π -типов (CNDO, INDO, AM1, PM3, PM6), поскольку в них предусмотрена возможность оптимизации геометрии с определением пространственного расположения внутримолекулярных

фрагментов, что особенно важно при изучении конформационных состояний сложных органических молекул, а также при расчёте физико-химических свойств, определяемых строением молекул.

Вычисление энергетических параметров молекул, основанных на данных об электронной структуре, эффективно осуществляются с использованием методов теории функционала плотности / Density Functional Theory (ТФП / DFT). С помощью методов данного семейства возможно получение информации не только о геометрическом строении молекул и твёрдых тел, но и об энергиях ионизации, частотах колебаний связей, что позволяет установить электрические и магнитные свойства веществ, понять механизм и пути протекания химических реакций и др.

В отличие от методов, основанных на применении волновой функции, методы ТФП используют физически наблюдаемую величину – электронную плотность $n(\mathbf{r})$, позволяющую определять энергию системы. Представление о том, что электронная плотность остаётся трёхмерной вне зависимости от числа образующих её электронов, позволило существенно снизить размерность задачи и оптимизировать вычислительное время, сделав метод доступным для расчёта крупных систем, содержащих до нескольких тысяч атомов. Электронная плотность определяется как интеграл по спиновым координатам всего числа электронов N и по всем пространственным переменным:

$$n(\mathbf{r}) = N \int \dots \int |\psi(x_1, x_2, \dots, x_N)|^2 dx_1 dx_2 \dots dx_N \quad (2)$$

где, ψ – многоэлектронная волновая функция системы.

Необходимость решения уравнения Шрёдингера для сотен взаимодействующих электронов была исключена Коном и Шэмом в 1965 году, поскольку в своей теории они предложили заменить их системой невзаимодействующих электронов, которые обладали бы той же электронной плотностью $n_S(\mathbf{r})$, что и система с взаимодействующими электронами $n(\mathbf{r})$:

$$n_S(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N |\psi_i(\mathbf{r})|^2 = n(\mathbf{r}) \quad (3)$$

где ψ_i – спин-орбитали невзаимодействующей системы, называемые орбиталями Кона-Шэма.

Согласно второй теореме ТФП, если любое свойство основного состояния молекулы можно выразить через электронную плотность, то электронная энергия является суммой кинетической энергии ($T[n]$), потенциальной энергии электронно-ядерных взаимодействий ($E_{en}[n]$) и энергии межэлектронных взаимодействий ($E_{ee}[n]$):

$$E(\mathbf{r}) = T[n] + E_{en}[n] + E_{ee}[n] \quad (4)$$

Энергия электронных взаимодействий определяется, в свою очередь, как сумма их кулоновского взаимодействия ($E_{Coul}[n]$) и обменно-корреляционной энергии системы ($E_{xc}[n]$). Для нахождения энергии $E_{xc}[n]$ требуется ввести некоторые приближения, самое простое из которых предполагает представление обменно-корреляционного потенциала как энергии, зависящей от локальных свойств однородного электронного газа. Оно получило название приближения локальной плотности (local density approximation, LDA) и подразумевает зависимость какого-либо свойства от электронной плотности только в данной точке. Для систем с вырожденными открытыми электронными оболочками требуется введение отдельной плотности всех компонент спинов и соответствующих спин-орбиталей Кона-Шэма – приближение локальной спиновой плотности (local spin density approximation, LSDA).

Добиться ещё большего повышения точности вычислений позволяет введение в функционал поправки, которая зависела бы градиента этой плотности, то есть позволяла бы учитывать пространственное изменение электронной плотности. Такой подход реализован в обобщённом градиентном приближении (generalized gradient approximation, GGA), определяющем обменно-корреляционные энергии системы по уравнению (5):

$$E_{xc}[n] = \int d\mathbf{r} n(\mathbf{r}) E_{xc}[\mathbf{r}], d \frac{dn(\mathbf{r})}{d\mathbf{r}}. \quad (5)$$

Данное приближение обладает более высокой точностью по сравнению с LDA, так как оно учитывает нелокальные электронные взаимодействия, при этом расчётное время остаётся практически неизменным.

Задача определения энергии сводится к итерационному решению набора одноэлектронных уравнений Кона-Шэма (6):

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla_1^2 + V_S(\mathbf{r}_1)\right)\psi_i^{KS} = \varepsilon_i\psi_i^{KS} \quad (6)$$

где V_S – потенциал системы невзаимодействующих электронов, для нахождения которого необходимо вычисление обменно-корреляционного потенциала (V_{XS}):

$$V_{XS} = \frac{\delta E_{XS}}{\delta n} \quad (7)$$

В современном программном обеспечении различных квантово-химических программ (GAUSSIAN, VASP, Spartan и др.) реализовано множество функционалов, позволяющих проводить вычисления по методу теории функционала плотности. К наиболее часто применяемым относятся функционалы Бекке-Пердью (BK), Пердью-Ванга (PW91), Бекке-Ли-Янга-Парра (BLYP). Разбиение обменно-корреляционного функционала на отдельные компоненты (обменный и корреляционный) позволяет пользователям программ использовать различные приближённые модели для описания энергий. Функционал B3LYP, например, состоит из трёх компонент: точного обменного оператора Хартри-Фока, функционала Бекке и функционала Слэтера. Корреляционная часть является комбинацией функционалов Ли-Янга-Парра (LYP) и Воско-Вилка-Нусара (VWN). Такой подход имеет некоторое сходство с полуэмпирическими методами, однако точность вычислений существенно повышается, как и расчётное время.

1.3.2 Моделирование свойств молекул азотсодержащих гетероциклов по структурным параметрам

Ранее было показано, что соединения, являющиеся производными азотистых нуклеозидов, а также содержащие в своём составе триазол-содержащие фрагменты, проявляют разнообразную биологическую активность. Исследования показывают, что свойства соединений определяются не только их химическим составом, но и геометрическим строением, таутомерным состоянием, распределением электронной плотности, а также способностью к образованию водородных связей.

Применение квантово-химических расчётных методов помогает в оценке этих характеристик и связи с физико-химическими свойствами, реакционной способности молекул и их биологической активностью [152].

Молекулярное моделирование помогает оценить связь между структурой молекул и проявляемыми ими свойствами. Количественная оценка такой зависимости в общем случае обозначается как QSPR (Quantitative Structure–Property Relationship). Модель типа «структура-активность» в современных исследованиях обозначается как QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), разработана в 1964 г. Ганчем и Фужитой, и позволяет спрогнозировать биологическую активность соединений [153,154].

Указанные модели обладают довольно высокой чувствительностью к используемым в них молекулярным дескрипторам – числовым параметрам, характеризующим свойства молекул. Основные дескрипторы подразделяются на:

1) *Одномерные (элементарного уровня)*: общие характеристики, содержащие информацию об атомах, входящих в молекулу, которые могут быть использованы при прогнозировании свойств в узких группах структурно-близких соединений. Точно предсказать возможно только молекулярную массу, число атомов конкретного типа, а также процентное содержание элементов.

2) *Двумерные (структурной формулы)*: описывают строение связей в плоской структурной формуле. К ним относятся топологические индексы, рассчитываемые с использованием теории молекулярных графов [155], и индексы разветвлённости молекул.

3) *Трёхмерные (пространственной структуры)*: характеризуют реальное геометрическое строение молекул, а также различные конформационные состояния (объём и площадь поверхности, момент инерции и др.).

4) *Четырёхмерные и выше (электронной структуры: молекулярной формы и межмолекулярных взаимодействий)*: описывают внутримолекулярные электронные свойства, связанные с распределением электронной плотности, а также энергетические параметры, например, энергии граничных орбиталей (ВЗМО/НСМО – высшую занятую / низшую

свободную молекулярные орбитали), термодинамические параметры (потенциалы ионизации молекул), дипольный момент и др.

Стоит отметить, что любая из перечисленных классификаций дескрипторов может описывать молекулу как в целом, так и её какой-либо отдельный фрагмент, например, заместитель или функциональную группу.

При выборе молекулярных дескрипторов для сравнения и прогнозирования свойств соединений исследователи руководствуются их информативностью. Так, в случае азотсодержащих гетероциклических соединений, например, триазолов, данные о числе атомов-доноров или акцепторов водородной связи, липофильности и молекулярной массе не отражают тонкие электронные различия в структуре, вызванные перераспределением заряда из-за введения в структуру кольца определённых заместителей [156].

При моделировании структур аналогов нуклеозидов, а также производных урацила особое внимание следует уделять выбору таутомерной формы, поскольку биологические свойства соединений могут отличаться у различных таутомерных и изомерных (например, оптических) соединений [157,158]. Такое поведение соединений связано с различиями в положении двойных связей и расположением протонов в молекуле, что оказывает влияние на возникающие межмолекулярные взаимодействия. На свойства нуклеозидов также влияет конформация углеводного мономера и ориентация гликозидной связи, поэтому параметры, полученные в результате расчётов для неверно выбранной конформационной структуры, могут привести к ненадёжным прогностическим результатам модели [159]. Квантово-химические расчётные программы оказываются незаменимы при определении геометрических и электронных параметров молекул, определяющих из физико-химические и структурные свойства. Однако полностью полагаться на результаты моделирования при прогнозировании биологической активности у новых соединений нельзя, поэтому численное моделирование способно лишь дополнить результаты интерпретируемыми признаками, но не полностью заменить, эксперимент.

Квантово-химические методы вычисления параметров молекул гетероциклических соединений используются также и при моделировании их адсорбционного поведения в условиях жидкостной хроматографии, что

важно при разработке эффективных методик разделения и идентификации [160–162].

Методология выполнения вычислений основана на проведении оптимизации первичной геометрии молекул соединений, формирующих структурно-близкий ряд. Для этой цели используются методы молекулярной динамики и полуэмпирические методы, направленные на поиск наиболее устойчивых конформационных форм молекул с последующей их оптимизацией [163–165]. Сократить расчётное время, а также осуществить скрининг довольно крупных многоатомных систем помогают расширенные квантово-химические методы сильной связи xTB, разработанные Гримме и коллегами [166–169].

Уточнение геометрии и вычисление электронных характеристик наиболее предпочтительно проводить с привлечением методов ТФП. Выбор функционала определяется свойствами, которые требуется найти: оптимизация геометрии, оценка относительной устойчивости таутомеров, описание сольватационных взаимодействий и др. Например, для расчёта электронной плотности, энергий атомных орбиталей и дипольных моментов молекул хорошо зарекомендовал себя функционал B3LYP и методы с поправками на дисперсию.

Биологическая активность азотсодержащих гетероциклических соединений также может быть оценена с помощью вычисления энергетических характеристик, таких как энергия ВЗМО и НСМО [170,171]. Информация о данных параметрах, согласно теории граничных молекулярных орбиталей, позволяет понять механизм перераспределения электронов в молекуле. Так, при изучении биологической активности производных 1,2,4-триазола экспериментальными и расчётными методами установлено, что в исследуемых соединениях ВЗМО в основном делокализована на триазольном цикле и атоме серы, на НСМО – на двойной связи основания Шиффа [170]. Таким образом, на основании полученных данных обнаружено, что основной вклад в биологическую активность производных 1,2,4-триазола вносят гетероциклический фрагмент, атом серы, а также бензольное кольцо. Данные соединения также продемонстрировали высокую антимикотическую активность в отношении

gibberella nicotiancola (A) – фитопатоген, замедляющий рост растений и способный вырабатывать токсины для человека и животных [172].

Квантово-химические расчёты используются не только для оценки биологической активности, но и для исследования адсорбционных свойств. Методы ТФП были применены для установления связи между молекулярной структурой производных пиримидина и их ингибирующей активностью в отношении коррозии низкоуглеродистой стали в кислых растворах [173].

QSPR-моделирование направлено на установление количественных корреляционных зависимостей между структурными параметрами молекул и их свойствами. Такой подход полезен при разработке аналитических методик разделения структурно близких трудноразделимых соединений, поскольку решение задачи прогнозирования хроматографического удерживания по данным о строении молекул позволило бы сократить затрачиваемое экспериментальное время. Кроме того, в задачах нецелевого анализа подобные модели оказались бы весьма полезны для идентификации неизвестных соединений по их физико-химическим параметрам.

Наибольшее число исследований, посвящённых разработке моделей «структура-удерживание» (Quantitative Structure-Retention Relationships, QSRR), проведены для режима газовой хроматографии (ГХ) [174]. Они представляют собой линейную корреляционную зависимость индексов удерживания органических соединений от одного или нескольких структурно-зависимых физико-химических параметров. Такие модели для режима ГХ описывают прямую связь между структурой соединений и адсорбционными характеристиками, поскольку в качестве элюента используется инертный газ-носитель. В условиях жидкостной хроматографии элюент, выполняя транспортную функцию, также оказывается участником адсорбционного процесса, поэтому выбор молекулярных дескрипторов, необходимых для построения наиболее точных QSRR-моделей, должен происходить с учётом возможности реализации в системе межмолекулярных взаимодействий между всеми участниками адсорбционного процесса.

В случае азотсодержащих гетероциклов, в особенности обладающих биологической активностью, применение жидкостной хроматографии как

аналитического метода является наиболее предпочтительным, поэтому в качестве дескрипторов для моделей могут использоваться параметры, связанные со свойствами растворимости, липофильности, кислотности/основности и др. [175].

Описываемые модели могут быть линейными и строиться, например, на методе наименьших квадратов (МНК). Применение большого числа молекулярных дескрипторов может быть реализовано с помощью статистических методов, например, множественной линейной регрессии (МЛР), учитывающего связь между одним свойством (хроматографическим удерживанием) от нескольких независимых переменных [176]. В последнее время большое развитие получают алгоритмы машинного обучения, однако их практическое применение к условиям ВЭЖХ ограничено малыми базами данных, необходимых для создания обучающей выборки.

Выводы по разделу 1.3

Таким образом, современные вычислительные методы квантовой химии открывают для исследователей широкие перспективы в изучении разнообразных систем, помогая интерпретировать получаемые экспериментальные результаты и лучше понять механизм протекания различных процессов. Современное компьютерное обеспечение открыло исследователям широкие возможности в изучении структурных и энергетических параметров многоатомных систем, при этом точность получаемых результатов достаточно близка к значениям, получаемым эмпирическим путём.

Использование многоуровневой классификации физико-химических параметров (дескрипторов) молекул для описания взаимосвязи между их строением и свойствами привело к попытке создания различных прогностических моделей. Так, были установлены хорошие корреляции между фармакофорными группами и проявляемой органическими соединениями биологической активностью. Различными математическими методами получены корреляционные модели типа «структура-удерживание», позволяющие в определённых хроматографических

условиях спрогнозировать адсорбционное поведение новых или малоизученных структурно близких органических соединений.

Выводы по Главе 1

Азотсодержащие гетероциклические соединения в настоящее время занимают особую нишу в группе фармакологических препаратов. Их структурные особенности открывают для исследователей возможности синтеза соединений, обладающих самой разнообразной биологической активностью. Высокие терапевтические показатели производных аналогов нуклеозидов в лечении онкологических и сложных аутоиммунных заболеваний делают эти соединения особенно актуальными для синтеза.

Хромато-масс-спектрометрические методы анализа успешно применяются при селективном разделении и препаративном выделении гетероциклических соединений из сложных смесей, и уже разработано большое число сорбентов, прекрасно справляющихся с этими задачами. Однако производство новых лекарственных препаратов открывает задачу разработки эффективных и надёжных способов идентификации как самих лекарственных средств, так и их метаболитов, образующихся в организме человека. Компьютерное моделирование и квантово-химические вычисления с развитием технического оснащения позволяют добиться высоких результатов в описании структурных особенностей гетероциклических соединений, их реакционной способности, а также установлении корреляционных зависимостей между строением молекул, положением заместителей, и свойствами, в том числе биологически активными, которыми обладают соединения.

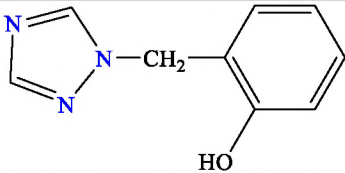
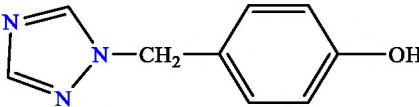
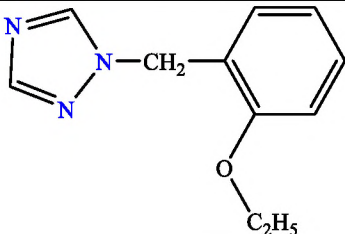
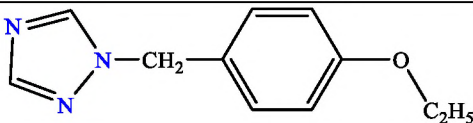
Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Объекты исследования

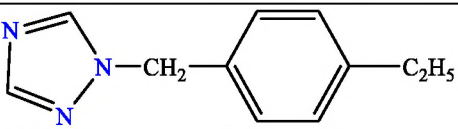
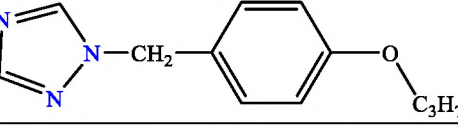
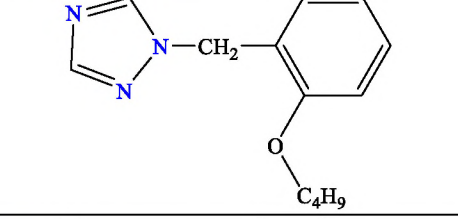
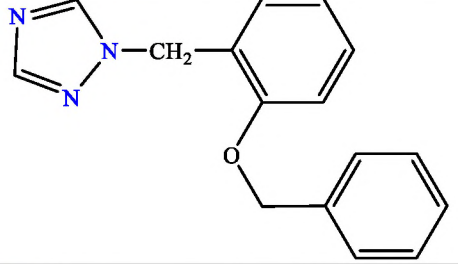
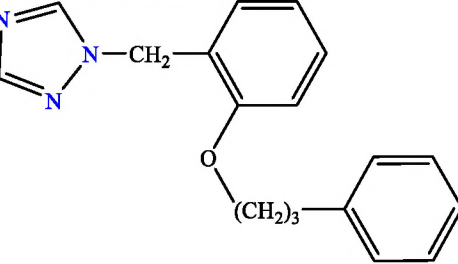
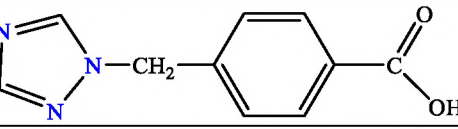
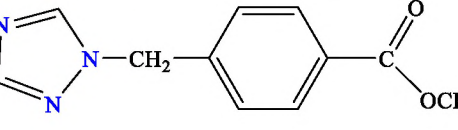
2.1.1 Производные 1,2,4-триазола

Изучение удерживания в обращённо-фазовом режиме ВЭЖХ проводили с использованием производных 1,2,4-триазола, содержащих заместители различной структуры. Исследуемые соединения синтезированы на кафедре органической, биоорганической и медицинской химии (в настоящее время кафедра неорганической химии) ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева». Образцы каждого гетероцикла готовились путём растворения в ацетонитриле с концентрацией 1 мг/мл и хранились в стеклянных виалах при 4 °С без доступа света. Структурные формулы объектов исследования приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Исследуемые азотсодержащие производные 1,2,4-триазола

№	Название	Структурная формула	Брутто-формула и молекулярная масса, Да
T1	2-(1H-триазол-1-илметил)фенол		C ₉ H ₉ N ₃ O 175.07
T2	4-(1H-триазол-1-илметил)фенол		C ₉ H ₉ N ₃ O 175.07
T3	1-[2-(бензилокси)этил]-1H-триазол		C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O 203.11
T4	1-[4-(бензилокси)этил]-1H-триазол		C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O 203.11

Продолжение таблицы 2.1

T5	1-[4-(бензил)этил]- 1H-триазол		C ₁₁ H ₁₃ N ₃ 187.11
T6	1-[4-(бензилокси) пропил]-1H-триазол		C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O 217.12
T7	1-[2-(бензилокси)бутил]- 1H-триазол		C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O 231.14
T8	1-[2-(бензилокси)бензил]- 1H-триазол		C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O 265.12
T9	1-[2-(бензилокси) бензопропил]-1H- триазол		C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O 293.15
T10	4-[1H-1,2,4-триазол- 1-илметил] бензойная кислота		C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₂ 203.07
T11	4-[1H-1,2,4-триазол- 1-илметил] метилбензоат		C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ 217.09

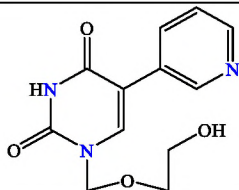
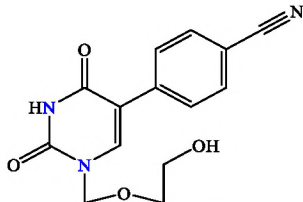
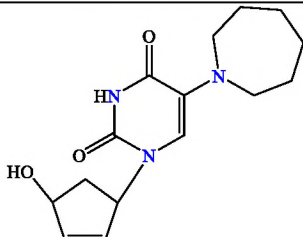
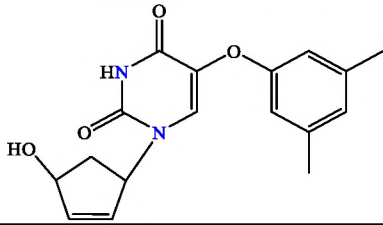
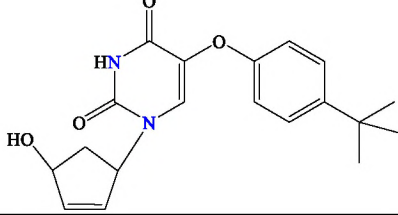
2.1.2 Производные урацила

Изучение удерживания методом ОФ ВЭЖХ и процессов фрагментации в условиях тандемной масс-спектрометрии проводили с использованием производных урацила – соединений, в структуре которого содержится шестичленный гетероциклический фрагмент. Объекты исследования синтезированы в лаборатории Молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии

им. В.А. Энгельгардта РАН [177]. Все указанные соединения проявили различную биологическую (противовирусную и цитотоксичную) активность в отношении возбудителей коронавируса SARS-HCoV OC43, респираторно-синцитиального вируса RSV штаммов A Long и 17D, цитотоксичность в отношении клеток карциномы печени человека. Образцы каждого гетероцикла готовились путём растворения в ацетонитриле с концентрацией 1 мг/мл и хранились в стеклянных виалах при 4 °С без доступа света.

Структурные формулы и результаты ингибирующей активности представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2. Исследуемые производные урацила

№	Название	Структурная формула	Брутто-формула и молекулярная масса, Да
У1	1-((2-гидроксиэтокси)метил)-5-(пиридин-3-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ 263.09
У2	4-(1-((2-гидроксиэтокси)метил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиридин-5-ил) бензонитрил		C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ 287.09
У3	5-(азепан-1-ил)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃ 291.16
У4	5-(3,5-диметилфенокси)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₄ 314.13
У5	5-(4-(трет-бутил)фенокси)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₄ 342.16

Продолжение таблицы 2.2

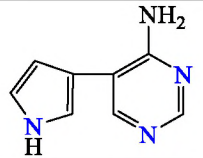
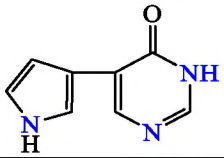
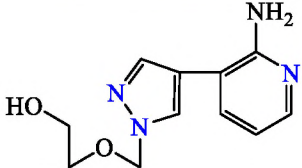
У6	5-(4-хлорфенокси)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{15}H_{13}N_2O_4Cl$ 320.06
У7	5-(азепан-1-ил)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{20}H_{27}N_3O_4$ 373.20
У8	5-(3,5-диметилфенокси)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{22}H_{24}N_2O_5$ 396.17
У9	5-(4-(трет-бутил)фенокси)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{24}H_{28}N_2O_5$ 424.20
У10	5-(4-хлорфенокси)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{20}H_{19}N_2O_5Cl$ 402.10
У11	5-((4-(трет-бутил)фенил)амино)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{24}H_{29}N_3O_4$ 423.22
У12	5-((4-гексилфенил)амино)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{26}H_{33}N_3O_4$ 451.25

2.1.3 Флексимерные производные пуриновых оснований

Изучение удерживания методом ОФ ВЭЖХ и процессов фрагментации в условиях тандемной масс-спектрометрии проводили с использованием соединений, содержащих в своём составе два гетероциклических фрагмента, соединённых углерод-углеродной связью – флексимерных аналогов пуриновых оснований. Эти соединения можно рассматривать с точки зрения шестичленного гетероцикла как производные пиридина или пиримидина. Объекты исследования синтезированы в лаборатории Молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [178,179]. Все указанные соединения проявили биологическую (ингибирующую) активность в отношении фермента пуриновой нуклеозидфосфорилазы (PNP) в отношении бактерий *Escherichia coli*. Образцы каждого гетероцикла готовились путём растворения в ацетонитриле с концентрацией 1 мг/мл и хранились в стеклянных виалах при 4 °С без доступа света.

Структурные формулы и результаты ингибирующей активности представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Исследуемые флексимерные производные азотсодержащих гетероциклических соединений

№	Название	Структурная формула	Брутто-формула и молекулярная масса, Да
П1	5-(1H-пиррол-3-ил) пиридин-4-амин		C ₈ H ₈ N ₄ 160.08
П2	5-(1H-пиррол-3-ил) пиридин-4(3H)-он		C ₈ H ₇ N ₃ O 161.06
П3	2-((4-(2-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол		C ₁₁ H ₁₄ N ₄ O ₂ 234.11

Продолжение таблицы 2.3

П4	2-((4-(4-аминопириимдин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол		$C_{10}H_{13}N_5O_2$ 235.11
П5	5-(1-((2-гидроксиэтокси)метил)-1Н-пиразол-4-ил)пиримидин-4(3Н)-он		$C_{10}H_{12}N_4O_3$ 236.10
П6	4-(4-(4-аминопиридин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)циклопент-2-ен-1-ол		$C_{12}H_{13}N_5O$ 243.11
П7	4-(4-(4-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол-1-ил)циклопент-2-ен-1-ол		$C_{13}H_{14}N_4O$ 242.12
П8	5-(пиридин-3-ил)-1Н-индазол		$C_{12}H_9N_3$ 195.08
П9	5-(пиримидин-5-ил)-1Н-индазол		$C_{11}H_8N_4$ 196.08

2.1.4 Дополнительные реактивы для хроматографического анализа

С целью определения «мёртвого» времени t_M для каждой хроматографической системы в режиме ОФ ВЭЖХ в качестве несорбируемого компонента использовали нитрит натрия (Sigma-Aldrich, США). Модифицирующей добавкой в элюент была выбрана муравьиная кислота (SRL, Индия).

2.1.5 Растворители

Растворы элюента готовили с использованием ацетонитрила марки HPLC-Gradient Grade с категорией чистоты «для ВЭЖХ-МС» 99,9% (PanReac AppliChem, Германия) и деионизированной воды, полученной с применением системы очистки Milli-Q (Merck, Германия) и АКБАЛАБ AL PLUS (Россия).

2.2 Оборудование

2.2.1 Жидкостная хроматография

Исследования методом ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащённого четырёхканальным насосом высокого давления, дегазатором подвижной фазы, блоком автоматического ввода пробы (автосамплером), термостатом хроматографических колонок и спектрофотометрическим многоволновым (диодно-матричным) детектором. Также в работе использован жидкостный хроматограф Shimadzu Nexera LC-40 (Shimadzu, Япония), состоящий из блоков дегазатора, четырёхканального насоса, устройства автоматического ввода пробы (автосамплера), термостата колонки.

Хроматографическое разделение всех азотсодержащих гетероциклических соединений проводили на колонке, заполненной пористым графитированным углеродом марки Hypercarb (Thermo Scientific, США) с диаметром частиц сорбента 3 мкм (размеры колонки 2,1 × 100 мм). Также в работе использовались колонки, заполненные октадецилсиликагелем (2,1 × 100 мм, диаметр частиц 3 мкм (Shim-pack GIST, Япония); 3,9 × 150 мм, диаметр частиц 5 мкм (Диасфер-110-С₁₈, Россия)) и цианопропильной неподвижной фазой (3,0×150 мм, диаметр частиц 3,5 мкм (Zorbax 80A SB-CN Solvent Saver Plus, Agilent, США)). В качестве подвижной фазы использовали смеси ацетонитрил/вода в различных объёмных соотношениях.

Исследование производных 1,2,4-триазола осуществляли в изократическом режиме без добавления в элюент муравьиной кислоты в

качестве модификатора, объёмная скорость потока подвижной фазы составляла 500 мкл/мин. Концентрация ацетонитрила в элюенте варьировалась в диапазоне от 30 до 80% (об.) с шагом 10%. Регистрацию сигналов соединений проводили с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 254 нм.

При исследовании производных урацила и флексимерных производных пиридина и пиримидина в каждый растворитель добавляли муравьиную кислоту в количестве 0,1 об. %. Анализ данных соединений на колонке, заполненной ПГУ, проводили с применением градиентного режима элюирования, имеющего изократический участок (таблица 2.4).

Таблица 2.4. Программа градиентного режима элюирования

Время, мин	Содержание ацетонитрила с муравьиной кислотой, %	Содержание воды с муравьиной кислотой, %
0	50	50
15	50	50
25	100	0
30	100	0
40	50	50
45	50	50

Указанный режим изменения состава подвижной фазы выбран таким образом, чтобы времена выхода целевых соединений попали в диапазон изократического элюирования, а примесные соединения полностью десорбировались с поверхности сорбента на участках градиентного элюирования. Скорость потока подвижной фазы составляла 250 мкл/мин и была постоянной.

2.2.2 Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением

Идентификацию азотсодержащих соединений, находящихся в смеси, а также изучение процессов их фрагментации проводили в режиме электрораспыления в условиях одномерной и tandemной масс-спектрометрии с применением квадруполь-времяпролётного масс-спектрометра высокого разрешения Bruker Maxis Impact QTOF (Bruker

Daltonics, Германия). Управление хромато-масс-спектрометрической системой осуществляли с помощью программного обеспечения HyStar Software (Bruker Daltonics, Германия). Последующую обработку результатов проводили с применением программного обеспечения DataAnalysis вер. 4.2 (Bruker Daltonics, Германия).

В качестве газа-распылителя и осушителя, а также для столкновения в режиме тандемной масс-спектрометрии, использовали азот. Расход газа-осушителя составлял 7 л/мин, давление газа-распылителя – 1,4 бар. Температура источника ионизации 250 °С. Регистрацию ионов осуществляли в режиме положительных ионов в диапазоне сканирования масс m/z от 40 до 1500 Да с разрешением 15000. Напряжение на капилляре распылителя составляло 4,5 кВ, энергия столкновения ионов – 40 эВ.

Калибровку масс-спектрометрического детектора проводили по внешнему стандарту с применением раствора формиата натрия путём прямого ввода. Статистическое отклонение определения массы не превышало 0,03 ppm.

При работе с жидкостным хроматографом Shimadzu 9030 LCMS квадруполь-времяпролётного масс-спектрометра высокого разрешения Shimadzu (Shimadzu, Германия). Обработку хроматограмм и масс-спектров осуществляли с помощью программного обеспечения Lab Solutions Software вер. 5.114 (Shimadzu, Япония).

2.2.3 Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Идентификацию азотсодержащих гетероциклических соединений на поверхности нержавеющей стали определяли с применением времяпролётного масс-спектрометра Bruker Daltonics UltraFlex с источником лазерной десорбции/ионизации. Фотоинициирование проводили с применением азотного лазера с длиной волны 337 нм. Выталкивающее напряжение составляло 25 кВ, доускоряющее напряжение – 18 кВ. Регистрацию масс-спектров положительно заряженных ионов осуществляли в диапазоне m/z от 40 до 1500 Да.

В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (DHB) и α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (CHCA) (Bruker Daltonics, Германия).

2.2.4 Квантово-химическое моделирование структур азотсодержащих гетероциклов

Изучение влияния структуры молекул азотсодержащих гетероциклов на хроматографическое удерживание проводили на основании теоретически рассчитанных физико-химических параметров (молекулярных дескрипторов): ван-дер-ваальсов объём молекул V [$\text{\AA}^3$], площадь поверхности S_W [$\text{\AA}^2$], полярная площадь поверхности молекулы PSA [$\text{\AA}^2$], липофильность $\log P$, поляризуемость α [$\text{\AA}^3$], дипольный момент молекул μ [D]. Расчёт физико-химических параметров структур проводился с использованием программы для квантово-химических вычислений *Spartan 14* для Windows (Wavefunction Inc., Ирвайн, Калифорния, США) [180,181]. Конформационный поиск структур с минимальной энергией проводился с применением метода молекулярной механики MMFF (Merck Molecular Force Field). Геометрии молекулярных структур всех исследованных соединений оптимизированы с помощью полуэмпирического метода PM3 (Parametrization Method 3).

Энергетические параметры молекул (стандартные молярные энтальпия ΔH° [кДж/моль] и энтропия ΔS° [Дж/моль], энергии высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) и низшей свободной молекулярной орбитали (НСМО) [кДж/моль]) рассчитаны методом теории функционала плотности (DFT) также с применением программы *Spartan 14*. Перечисленные характеристики вычислены для нейтральных и протонированных форм соединений с использованием гибридного обменно-корреляционного трёхпараметрического функционала плотности B3LYP с базисным набором 6-311G*.

Для определения наиболее вероятных атомов-акцепторов протона в нейтральных молекулах гетероциклов при их ионизации методом электрораспыления вычисляли значения сродства к протону (РА). Данный

параметр рассчитывается как отрицательное значение изменения энтальпии ΔH° для реакции $M + H^+ \rightarrow MH^+$:

$$PA = -\Delta H^\circ(MH^+), \quad (8)$$

а изменение энтальпии ΔH° вычисляется как

$$\Delta H^\circ = E_{эл}(MH^+) - (E_{эл}(M) + E_{эл}(H^+)), \quad (9)$$

где $E_{эл}$ – полная энергия электронов системы, включающая кинетическую энергию, потенциальную энергию электронно-ядерных взаимодействий и энергию межэлектронных взаимодействий, кДж/моль. Для протона учитывается только разность поступательной энергии как $3/2RT$, так как все остальные энергетические параметры численно равны нулю [182].

Расчёт топологических индексов и молекулярных дескрипторов, характеризующих строение гетероциклических соединений, проведён с использованием программного приложения *Mordred*, разработанного для вычисления двух- и трёхмерных дескрипторов по записи формул соединений в виде SMILES-формул [183]. Указанная программа позволяет вычислить до 1800 различных молекулярных дескрипторов, на основании которых возможно построить зависимости между структурой анализируемых молекул и их свойствами, которые используются в исследованиях типа «структура – активность» (QSAR) или «структура – свойство» (QSRP).

Поиск наиболее устойчивых конформационных структур проводился с использованием инструмента для выборки конформеров и ротамеров *CREST* (Conformer–Rotamer Ensemble Sampling Tool) – программного пакета с открытым исходным кодом [184,185]. С помощью данной программы найдены наиболее вероятные места протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина. Оптимизация геометрии молекул исследуемых гетероциклов осуществлялась с применением полуэмпирического квантово-химического метода на уровне расширенного приближения сильной связи xTB в рамках теории функционала плотности [166]. Расчёт энергетических параметров осуществлялся на основе методов GFNn-xTB (n = 0, 1, 2), ориентированных на молекулярные свойства, такие как геометрия, частоты и нековалентные взаимодействия. В работе использовался самый быстрый метод указанного

семейства – GFN0-хТВ, позволяющий получить результаты с приемлемой квантово-механической точностью без использования ресурсоёмких итераций самосогласованного поля.

2.2.5 Расчёт термодинамических характеристик сорбции производных 1,2,4-триазола

Термодинамическое описание хроматографического процесса основывается на представлении о квазиравновесности процесса, при котором локальное распределение адсорбата между элюентом и неподвижной фазой в каждый момент времени близко к равновесному. С использованием уравнений классической равновесной термодинамики (уравнению изотермы химической реакции (1) и уравнению изобары Вант-Гоффа (2)) возможно определение изменения стандартных молярных энтальпии и энтропии перехода молекул адсорбата из объёма подвижной фазы на поверхность сорбента.

$$\Delta G_T^\circ = \Delta H_T^\circ - T\Delta S_T^\circ = -RT \ln K \quad (10)$$

$$\left(\frac{\ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \right)_p = -\frac{\Delta H_T^\circ}{R}, \quad (11)$$

где ΔG_T° – изменение значений стандартной молярной энергии Гиббса, кДж/моль; ΔH_T° – изменение значений стандартной молярной энтальпии, кДж/моль; ΔS_T° – изменение значений стандартной молярной энтропии, кДж/(моль·К); R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль·К); T – температура колонки, К; K – константа адсорбционного равновесия.

На основании экспериментальных данных о сорбции производных 1,2,4-триазола, полученных при различных температурах колонки, вычислены значения некоторых термодинамических характеристик. Экспериментально определяемым параметром, связанным с константой равновесия, является фактор удерживания (k), рассчитываемый по уравнению (3):

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}, \quad (12)$$

где t_R – время удерживания анализируемого соединения, мин; t_M – время удерживания несорбируемого компонента (нитрита натрия), мин.

Модифицированное уравнение Вант-Гоффа связывает хроматографические и термодинамические параметры:

$$\ln k = -\frac{\Delta H_T^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_T^\circ}{R} + \ln \beta, \quad (13)$$

где β – фазовое отношение хроматографической колонки, определяемое как отношение объёма элюента (V_M) к объёму неподвижной фазы (V_S) по методу [186].

Экспериментальное вычисление констант Генри адсорбции ($K_{1,c}$) производных 1,2,4-триазола на поверхности ПГУ осуществляли по линейному уравнению (4) [97]:

$$\ln K_{1,c} = -\frac{\Delta H_T^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_T^\circ}{R}. \quad (14)$$

Константы Генри позволяют описать характер взаимодействия молекул гетероциклов с сорбентом и количественно оценить величину адсорбции.

2.2.6 Молекулярно-статистический расчёт констант Генри адсорбции производных 1,2,4-триазола

Удерживание молекул органических соединений на поверхности различных сорбентов определяется типами реализуемых в системе межмолекулярных взаимодействий, которые зависят не только от химического состава, но и от геометрического строения участников. Пористый графитированный углерод обладает плоской поверхностью, а также благодаря π -электронной системе способен к образованию π - π -связей с ненасыщенными, в том числе с ароматическими, фрагментами молекул [187]. Использование молекулярно-статистических алгоритмов позволяет смоделировать характер взаимодействия гетероциклических молекул, содержащих заместители различного строения, с поверхностью углеродного сорбента.

Теоретические расчёты способствуют существенному сокращению экспериментального времени за счёт предварительной оценки разделяющей способности сорбента. Кроме того, глубокое понимание теоретических

аспектов механизма адсорбции позволяет по экспериментальным данным установить структурную формулу неизвестных соединений, что критически важно при использовании совокупности аналитических методов в нецелевом анализе.

В 70-е годы XX века разработан молекулярно-статистический метод прогнозирования термодинамических характеристик адсорбции, позволяющий на основании данных о структурной формуле органических молекул определить последовательность удерживания на химически и математически однородной поверхности сорбента в условиях газовой хроматографии [188]. Наиболее подходящим модельным сорбентом является графитированная термическая сажа (ГТС) – сорбент с однородной плоской поверхностью, который широко использовался для экспериментального разделения большого числа соединений, в том числе изомерных, в условиях газовой хроматографии.

В основе описываемого метода лежит алгоритм Метрополиса, учитывающий вклад в адсорбцию различных конформаций молекул, внутренняя энергия которых оценивается с помощью классических формул молекулярной динамики [189]. Методы молекулярной динамики включают в себя модель атом-атомного приближения, подразумевающего точечное взаимодействие между ядрами атомов без рассмотрения электронной структуры молекул и квантовых эффектов, связанных с ней.

Теоретические значения констант Генри адсорбции из газовой фазы *in vacuo* на поверхности ГТС могут быть вычислены с использованием специального программного обеспечения, разработанного в ИФХЭ РАН по формуле (5) [190–192]:

$$K_{1,c} = \frac{V}{A} \cdot \frac{N_{\text{адс}}}{N_{\text{об}}} = \frac{V \int_{\text{адс}} e^{\frac{-(\Phi_{\text{ВН}}(\vec{r}) + \Phi_{\text{адс}}(\vec{r}))}{kT}} d\vec{r}}{A \int_{\text{об}} e^{\frac{-\Phi_{\text{ВН}}(\vec{r})}{kT}} d\vec{r}}, \quad (15)$$

где V – объём системы; A – площадь поверхности системы; $N_{\text{адс}}$ – количество адсорбированных на поверхности молекул; $N_{\text{об}}$ – количество молекул в объёмной фазе; $\Phi_{\text{адс}}$ – потенциальная энергия взаимодействия

молекулы с адсорбентом; $\Phi_{\text{вн}}$ – внутренняя конформационная энергия молекулы.

Геометрию производных 1,2,4-триазола оптимизировали с помощью метода молекулярной динамики MMFF94. Расчёт конформационных энергий молекул гетероциклов, параметры для нековалентных взаимодействий, формы функций и правила смещения, описывающие взаимодействие с поверхностью ГТС, проводились с использованием силового поля GAFF (General Amber Force Field) [193]. Адсорбционное взаимодействие молекул гетероциклов с поверхностью ГТС описывалось атом-атомными потенциалами в форме Леннард-Джонса для каждого атома молекул азолов, проинтегрированных аналитически относительно слоёв графита [194].

Глава 3. Обсуждение результатов

3.1 Квантово-химическое и молекулярно-статистическое моделирование для описания структуры азотсодержащих гетероциклических соединений

3.1.1 Расчёт физико-химических параметров молекул азотсодержащих гетероциклов

На сорбционное поведение органических молекул в условиях жидкостной хроматографии большое влияние оказывают структура и положение заместителей. Внедрение различных функциональных групп, циклических, линейных или ароматических фрагментов способно существенно изменить характер взаимодействия соединения с поверхностью сорбента за счёт появления новых типов межмолекулярных взаимодействий.

Известно, что полярные молекулы на поверхности неполярных адсорбентов удерживаются за счёт дисперсионных, а также электростатических индукционных взаимодействий. Кроме того, с уменьшением гидрофобности органических молекул снижается расстояние между ними и сорбентом, что способствует росту удерживания веществ.

Для первоначальной оценки влияния строения азотсодержащих гетероциклических соединений на хроматографическое удерживание при помощи квантово-химического расчётного метода теории функционала плотности были получены некоторые физико-химические и геометрические параметры молекул производных 1,2,4-триазола, урацила, а также флексимерных производных пиридина и пиримидина. Результаты вычислений приведены в таблицах 3.1-3.3.

Таблица 3.1. Физико-химические и геометрические характеристики исследуемых производных 1,2,4-триазола

№	μ [D]	$\log P$	α [Å ³]	V [Å ³]	S_W [Å ²]	PSA [Å ²]
T1	3.85	-0.15	54.39	177.47	196.00	32.96
T2	5.18	-0.15	54.47	178.78	202.49	40.15
T3	5.36	0.30	57.62	217.06	241.89	25.40
T4	5.55	0.30	57.61	217.28	243.92	26.95
T5	4.38	1.53	56.80	208.29	233.58	20.22
T6	5.42	0.78	59.10	235.68	264.21	27.00
T7	5.36	1.20	60.61	253.89	282.38	25.43
T8	5.25	0.89	62.96	282.87	303.48	25.24
T9	5.35	1.59	65.95	319.72	345.08	25.43
T10	2.68	0.18	56.24	199.42	223.77	53.83
T11	2.93	0.44	57.84	219.39	243.07	41.63

Таблица 3.2. Физико-химические и геометрические параметры исследуемых производных урацила

№	μ [D]	$\log P$	α [Å ³]	V [Å ³]	S_W [Å ²]	PSA [Å ²]
Y1	5.16	-0.87	60.58	251.23	277.25	73.62
Y2	6.33	0.11	62.79	277.50	300.99	83.10
Y3	5.70	1.22	64.94	301.06	315.68	50.96
Y4	7.32	2.19	64.02	312.46	335.74	66.73
Y5	5.92	1.59	68.69	350.97	371.91	68.17
Y6	7.54	3.15	63.95	292.82	315.05	68.08
Y7	7.05	1.94	71.09	378.65	387.80	61.57
Y8	2.90	2.56	51.64	157.60	177.27	44.06
Y9	3.86	3.51	75.58	435.58	453.84	74.88
Y10	5.66	2.31	70.83	377.45	396.97	74.81
Y11	5.23	3.71	76.01	438.37	455.10	76.66
Y12	3.73	4.99	79.15	477.08	504.03	76.84

Таблица 3.3. Физико-химические и геометрические характеристики исследуемых флексимерных производных пиридина и пиримидина

№	μ [D]	$\log P$	α [Å ³]	V [Å ³]	S_w [Å ²]	PSA [Å ²]
П1	7.69	-0.98	53.34	161.70	181.07	49.05
П2	2.90	-1.03	51.64	157.60	177.27	44.06
П3	3.89	-0.61	59.28	235.10	265.13	68.91
П4	6.43	-1.22	59.28	230.93	262.41	78.00
П5	6.65	-1.46	58.51	224.65	248.19	63.75
П6	5.92	-1.02	57.91	238.09	261.15	68.08
П7	4.74	-1.57	58.41	244.57	266.06	60.71
П8	1.89	-0.52	56.62	202.03	215.67	32.45
П9	3.85	-1.13	56.12	195.62	210.36	39.86

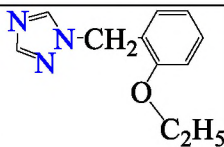
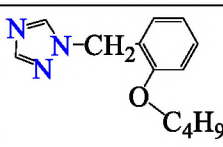
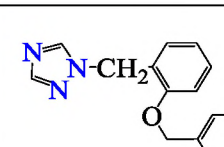
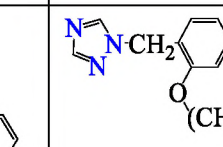
По результатам расчётов для оптимизированных полуэмпирическим методом PM3 структур получены значения ван-дер-Ваальсова объёма V [Å³], общей S_w [Å²] и полярной PSA [Å²] площади поверхности молекул, липофильности $\log P$, поляризуемости α [Å³] и дипольного момента μ [D]. Рассчитанные параметры использовались для оценки влияния строения заместителей на различные физико-химические свойства молекул.

Так, например, установлено, что при введении в структуру гетероциклов гидроксильной группы наблюдается снижение численных значений липофильности и поляризуемости молекул, причём изменения данных параметров симбатны. В случае 2-(1H-триазол-1-илметил)фенола (Т1) и 4-(1H-триазол-1-илметил)фенола (Т2), являющихся *орто*- и *пара*-изомерами, положение гидроксильной группы не оказывает влияния на указанные параметры, и они изменяются незначительно, однако замена гидроксильной группы на эфирную путём введения алифатического заместителя (соединение Т3 – 1-[2-(бензилокси)этил]-1H-триазол) приводит к возрастанию липофильности и поляризуемости. Увеличение длины углеводородного заместителя (Т7 – 1-[2-(бензилокси)бутил]-1H-триазол) также способствует росту значений данных параметров, что приводит к изменению способности растворяться в воде, т.е. соединения становятся менее гидрофильными, но приобретают лучшую проникающую способность через липофильную оболочку клеточных мембран. Также результаты квантово-химических вычислений показали, что все

исследованные флексимерные производные пиридина и пиримидина, связанные лабильной углерод-углеродной связью с пиррольным или пиазольным циклом и обладающие повышенной гибкостью (соединения П1 – П9), являются гидрофильными соединениями, т.к. значения липофильности у них отрицательны. Это свойство у данных молекул обусловлено наличием amino- или кето-группы у шестичленных циклов и присутствием гидроксильной группы в линейном или циклическом заместителе, связанным с пятичленным гетероциклическим фрагментом. Полученная в ходе исследований информация о липофильности является важным фактором при разработке лекарственных препаратов и методов их разделения и доставки до клеточных структур.

Расчёт таких параметров как ван-дер-Ваальсов объём и площадь поверхности молекул является важной характеристикой заместителей, описывающих изменение геометрических размеров молекул вследствие введения различных заместителей в структуру гетероциклов. Например, в случае исследуемых производных 1,2,4-триазола положение гидроксильной группы ввиду её малых размеров не оказывает значительного влияния на геометрические параметры молекул в целом (пара *орто*- и *пара*-изомеров Т1 и Т2) также, как и положение этокси-группы (соединения Т3 и Т4 – 1-[4-(бензилокси)этил]-1Н-триазол). При расположении заместителей в *пара*-положении площадь поверхности возрастает на 2-6 Å² по сравнению с их *орто*-изомерами. Более заметным оказывается влияние циклических заместителей, связанных с молекулой гетероцикла через алифатические мостики. Например, с увеличением длины углеводородного радикала от этила до бензопропила наблюдается закономерный рост численных значений объёма и площади поверхности молекул (таблица 3.4).

Таблица 3.4. Физико-химические параметры, рассчитанные для производных 1,2,4-триазола

№	T3	T7	T8	T9
Формула				
$V [\text{\AA}^3]$	217.06	253.89	282.87	319.72
$S_W [\text{\AA}^2]$	241.89	282.38	303.48	345.08
$\alpha [\text{\AA}^3]$	57.62	60.61	62.96	65.95

При этом наблюдается увеличение численных значений поляризуемости, которое приводит к усилению межмолекулярных дисперсионных взаимодействий и проявлению гидрофобного эффекта при адсорбции на неполярных сорбентах в водной среде.

3.1.2 Вычисление топологических параметров производных урацила

С помощью программного пакета *Mordred* рассчитаны топологические индексы Загреба ($Zag1$) и Балабана (J), топологическая полярная площадь молекулы $TPSA [\text{\AA}^2]$, индекс электротопологического состояния атомов ($VSA_EState1$), топологический дескриптор плоской формы ($PBF [\text{\AA}]$), характеризующие геометрическое строение молекул (табл. 3.5). Указанные параметры использовались для оценки влияния строения заместителей на различные физико-химические свойства молекул.

Таблица 3.5. Топологические индексы исследуемых производных урацила

№	$Zag1$	J	$TPSA$	$VSA_EState1$	PBF
У1	92	1.87	196	6.28	0.52
У2	102	1.86	160	6.26	0.65
У3	110	1.66	148	1.52	0.79
У4	122	1.59	164	7.03	1.06
У5	146	1.56	155	2.86	0.97
У6	134	1.53	163	7.04	1.00
У7	116	1.56	149	6.83	0.78
У8	158	1.51	143	8.46	1.06

Продолжение таблицы 3.5

У9	170	1.45	129	8.47	1.10
У10	152	1.49	156	8.23	1.15
У11	170	1.45	150	2.68	1.02
У12	172	1.36	164	2.70	0.97

Индексы Загреба и Балабана используются для описания топологической формы молекул, а их расчёт напрямую связан с числом атомов в молекулах и зависит от расположения связей [195]. Значения индекса Балабана позволяют различать сложные изомерные молекулы, а также сильно разветвлённые структуры, содержащие циклические фрагменты и гетероатомы. Практическое применение данного дескриптора в хемоинформатике отражает связь структуры соединений и зависящих от неё физико-химических параметров и биологической активности (токсичности, фармакокинетических параметров и др.). Анализ результатов расчётов, полученных для производных урацила, показал, что увеличение числа циклопентеновых заместителей, связанных с гетероциклом, приводит к снижению численных значений индекса Балабана J (для пар соединений **У3** и **У7**, **У4** и **У8**, **У5** и **У9**, **У6** и **У10**). При сравнении полученных результатов с вычисленными значениями липофильности (табл. 3.2) позволило обнаружить обратную корреляцию между этими параметрами: с снижением J происходит рост $\log P$, следовательно, молекулы становятся более гидрофобными. Однако для производных урацила, содержащих атомы хлора в *пара*-положении бензольного кольца заместителя, наблюдается противоположная зависимость.

Данные о топологической полярной площади поверхности – молекулярном дескрипторе, определяющем площадь поверхности всех полярных атомов в молекуле, позволяют получить более полную информацию об удерживании в условиях жидкостной хроматографии [196]. Высокие значения $TPSA$ свидетельствуют о меньшем времени удерживания молекул на поверхности неполярных сорбентов (режим ОФ ВЭЖХ), поскольку такие молекулы адсорбатов способны к образованию водородных связей с молекулами элюента, что будет способствовать более быстрому вымыванию соединений из хроматографической колонки.

Поскольку исследуемые производные урацила содержат концевые полярные гидроксильные группы, а также кето- и циано-группы (для соединения **У1**), то данное свойство дескриптора напрямую коррелирует с геометрическим строением молекул гетероциклов. Также полученные результаты расчётов значений *TPSA* могут быть использованы для разработки моделей «структура-активность», так как данный параметр определяет способность молекул биологически активных соединений проникать через клеточную стенку и позволяет получить информацию о его биодоступности. Информация о полярности молекул является важным параметром, так как помогает в установлении возможностей пероральной доступности препарата и преодоления гематоэнцефалического барьера (обеспечение адресной доставки лекарственного средства до нервной системы).

Индекс электротопологического состояния атомов (*VSA_EState1*) – гибридный молекулярный дескриптор, представляющий собой распределение электронов в молекуле с учётом её топологии (площади поверхности Ван-дер-Ваальса) [197]. Применение данного индекса для описания взаимосвязи с удерживанием в условиях ВЭЖХ обусловлено тем, что он сочетает в себе информацию как о геометрии молекулы, так и об электронных характеристиках (зарядах и их плотности). Иными словами, индекс *VSA_EState1* позволяет учесть стерические экранирования зарядов, а также определить доступность функциональных групп для взаимодействия с компонентами хроматографической системы.

Дескриптор плоской формы молекул применяется в ВЭЖХ с целью прогнозирования селективности разделения структурно близких молекул на поверхности неполярных адсорбентов вследствие объёмного или планарного строения молекул [198]. Известно, что плоские молекулы, в особенности содержащие π -электроны, способны к более прочному связыванию с π -системой ПГУ, а также к более глубокому проникновению в объём ОДС-фазы между алкильными цепями. Однако, как указывалось ранее в работе, адсорбция в условиях ВЭЖХ определяется совокупностью различных межмолекулярных сил. По этой причине для более подробного изучения влияния строения заместителей на адсорбцию и построения адекватных прогностических моделей целесообразным является изучение

зависимости фактора удерживания от совокупности нескольких физико-химических параметров, применяемых одновременно.

3.1.3 Расчёт термодинамических характеристик производных 1,2,4-триазола молекулярно-статистическим методом

Определение взаимосвязи между геометрическим строением молекул гетероциклов и их адсорбционными характеристиками является фундаментальной научной задачей, направленной на решение различных практических аспектов. Применение расчётных методов моделирования позволяет не только существенно снизить экспериментальное время, но и более точно охарактеризовать механизмы взаимодействия, реализуемые в системах «адсорбат – адсорбент».

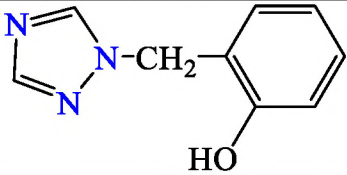
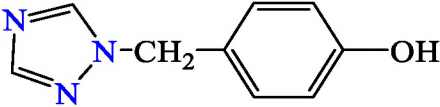
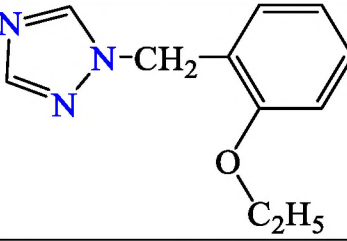
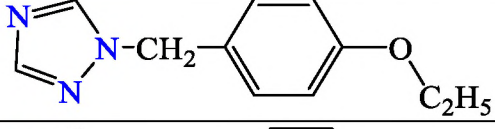
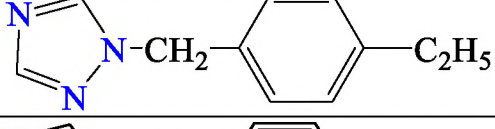
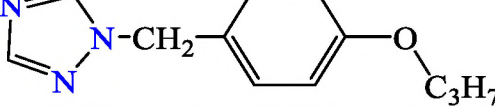
Одним из таких направлений является оптимизация методик разделения структурно близких соединений, являющихся изомерами или гомологами. Однако задачи прогнозирования сорбционного поведения веществ, в частности содержащих гетероциклические фрагменты, определения порядка выхода соединений из колонки в условиях жидкостной хроматографии на сегодняшний день полностью не решены. Причина этого заключается в совокупности конкурирующих межмолекулярных взаимодействий, реализуемых в хроматографической системе.

Молекулярно-статистический метод для расчёта констант Генри позволяет учесть дисперсионные взаимодействия, возникающие между молекулой исследуемого соединения и поверхностью ГТС в условиях предельно малых концентраций без учёта компонентов растворителя. В данном случае значения логарифмов констант Генри будут отражать силу взаимодействия адсорбата с плоской углеродной поверхностью: чем выше численное значение $\ln K_{1,C}$, тем более выражено удерживание [188]. Органические молекулы, содержащие ароматические фрагменты, расположенные в одной плоскости, будут иметь наиболее высокие значения констант Генри. Введение в структуру гетероцикла объёмных и разветвлённых заместителей наоборот приведёт к возникновению стерических препятствий, уменьшающих площадь контакта молекулы с

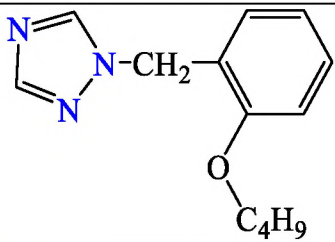
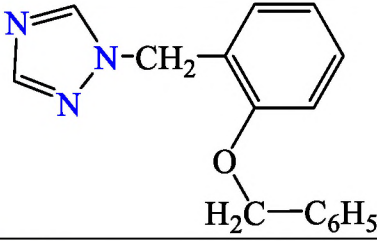
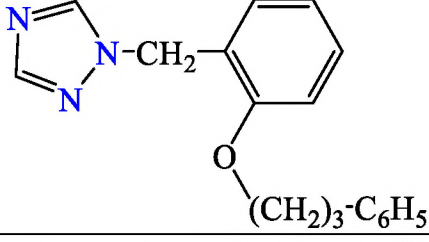
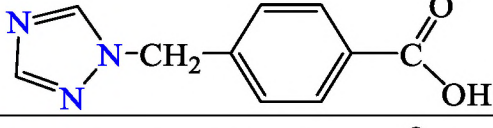
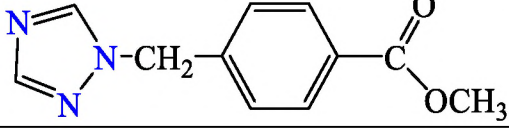
поверхностью сорбента, что будет выражаться в снижении констант Генри адсорбции. В случае алкильных углеводородных заместителей удерживание на ГТС будет линейно расти по мере увеличения длины углеродной цепи.

Для оценки влияния геометрии молекул производных 1,2,4-триазола на удерживание на поверхности углеродного сорбента молекулярно-статистическим методом получены значения логарифмов констант Генри (табл. 3.6).

Таблица 3.6 – Константы Генри ($\ln K_{1,c}$), полученные молекулярно-статистическим моделированием, значения фактора удерживания, определённые методом жидкостной хроматографии (сорбент: пористый графитированный углерод марки Supercarb; элюент: ацетонитрил/вода в соотношении 60:40% (об.); T = 318 K)

№	Структурная формула	$\ln k$	$\log P$	$\ln K_{1,c}^{\text{расч.}}$
T1		0.32	0.38	11.84
T2		0.26	0.38	12.15
T3		0.75	1.56	16.99
T4		0.72	1.56	15.84
T5		0.73	2.11	13.18
T6		0.88	2.09	17.07

Продолжение таблицы 3.6

T7		1.18	2.62	18.14
T8		1.86	2.68	22.8
T9		0.28	3.59	24.76
T10		0.47	0.79	13.53
T11		0.95	1.09	13.34

Полученные молекулярно-статистическим методом константы Генри адсорбции для производных 1,2,4-триазола показывают, что с увеличением длины углеводородного заместителя, находящегося в *орто*- (соединения **T4**, **T6**) или *пара*-положении бензольного кольца (соединения **T3**, **T7**, **T8** и **T9**) также возрастают. Результаты молекулярно-статистических вычислений согласуются с экспериментально полученными значениями фактора удерживания, однако для производного **T9** наблюдается исключение: при максимальном значении константы Генри фактор удерживания соединения на поверхности ПГУ минимален. Такое поведение, вероятно, связано со стерическими препятствиями, возникающими вследствие конформационного вращения ароматических колец вокруг σ -связей в растворе элюента, в результате чего циклы оказываются расположены в разных плоскостях относительно поверхности ПГУ.

При сравнении результатов молекулярно-статистических вычислений и экспериментальных значений констант Генри, полученных на основании термодинамических величин по уравнению (15), между этими параметрами установлена средняя положительная корреляция, поскольку значения коэффициента Пирсона находятся в диапазоне от 0.25 до 0.49 [199]. В таблице 3.7 приведены коэффициенты корреляционных уравнений вида

$$\ln K_{1,C}^{\text{расч.}} = a \ln K_{1,C}^{\text{эксп.}} + b \quad (16)$$

и коэффициент Пирсона, характеризующий линейность связи экспериментальных и теоретических значений констант Генри для производных 1,2,4-триазола.

Таблица 3.7.

Температура, К	Коэффициент a	Коэффициент b	Коэффициент Пирсона r_p
298	2.24	17.63	0.38
318	2.16	15.02	0.41
338	1.87	13.57	0.37

Описываемый уровень корреляции обусловлен различиями в межмолекулярных взаимодействиях, возникающих при переходе молекул производных триазола из газовой и жидкой фаз на поверхность углеродного сорбента. В условиях жидкостной хроматографии молекулы растворителя создают дополнительные конкурентные взаимодействия как с поверхностью ПГУ, так и с молекулами гетероциклов, приводящие к снижению энергии взаимодействия аналитов с сорбентом.

Показано, что с использованием молекулярно-статистического метода, основанного на алгоритме Метрополиса, можно оценить влияние структуры заместителя на удерживание на поверхности углеродного сорбента. Однако для азотистых гетероциклов, адсорбируемых из водно-органических растворов, такая оценка будет лишь приближённой, поскольку для реальной системы необходим учёт дополнительных параметров, характеризующих влияние растворителя на удерживание.

Выводы по разделу 3.1

1. Применение квантово-химических методов (полуэмпирических и ТФП) позволяет достаточно точно охарактеризовать структуру и свойства молекул производных гетероциклических соединений (1,2,4-триазола урацила, аналогов нуклеозидов). Для этого применяется огромное число разнообразных молекулярных дескрипторов, описывающих как самые простые свойства молекул (одномерные), так и геометрическую (объёмное) и электронную структуру, позволяющие более глубоко исследовать межмолекулярные взаимодействия.

2. С помощью методов молекулярно-статистического моделирования охарактеризованы новые производные 1,2,4-триазола с позиции межмолекулярных взаимодействий, возникающих при адсорбции на поверхности углеродных сорбентов из газовой фазы. Полученные результаты расчётов константы Генри адсорбции были сравнены с экспериментальными, полученными в условиях ОФ ВЭЖХ, и объяснены различия в значениях.

3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография азотсодержащих гетероциклических соединений

3.2.1 Адсорбция производных 1,2,4-триазола в условиях обращённо-фазовой жидкостной хроматографии

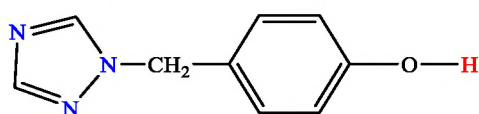
На начальном этапе методом ВЭЖХ проанализированы некоторые производные 1,2,4-триазола в режиме изократического элюирования смесью ацетонитрил – вода на поверхности октадецилсиликагеля. Результаты экспериментально полученных значений фактора удерживания представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. Численные значения фактора удерживания производных 1,2,4-триазола на поверхности октадецилсиликагеля ($T = 298\text{ K}$)

Соединение	Содержание ацетонитрила в элюенте, % (об.)			
	30	50	60	80
T1	0.73	0.37	0.27	0.19
T2	0.50	0.29	0.24	0.18
T3	3.76	1.15	0.68	0.43
T5	2.98	0.98	0.60	0.38
T6	7.05	1.63	0.90	0.51
T8	4.49	2.23	1.03	0.48

Адсорбция на поверхности октадецилсиликагеля осуществляется преимущественно за счёт дисперсионных взаимодействий. Из полученных данных следует, что производные 1,2,4-триазола на ОДС удерживаются слабо, ввиду возникающих конкурентных взаимодействий с молекулами элюента. Увеличение содержания воды в подвижной фазе более 50% в целом позволяет достичь приемлемой селективности разделения, однако в случае сорбатов с функциональными группами, способными к образованию водородных связей с молекулами растворителя (Т1 и Т2), изменение состава элюента практически не влияет на удерживание.

Введение в структуру производных триазола заместителей, блокирующих активность функциональных групп, приводит к изменению физико-химических свойств молекулы и, как следствие, удерживания.



$$k(30:70) = 0.50$$

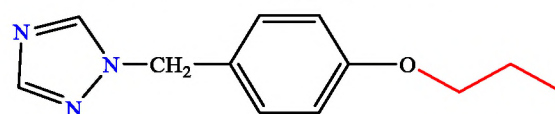
$$\log P = -0.15$$

$$\alpha [\text{\AA}^3] = 54.47$$

$$V [\text{\AA}^3] = 178.78$$

$$S_w [\text{\AA}^2] = 202.49$$

$$PSA [\text{\AA}^2] = 40.145$$



$$k(30:70) = 7.05$$

$$\log P = 0.78$$

$$\alpha [\text{\AA}^3] = 59.10$$

$$V [\text{\AA}^3] = 235.68$$

$$S_w [\text{\AA}^2] = 264.21$$

$$PSA [\text{\AA}^2] = 27.00$$

При сравнении хроматографических и физико-химических параметров производных триазола (соединения Т2 и Т6) видно, что замена

атома водорода в гидроксильной группе на линейный пропильный радикал приводит к многократному росту удерживания на поверхности октадецилсиликагеля. Такое поведение можно объяснить увеличением поляризуемости, объёма и площади поверхности молекулы 1-[4-(бензилокси)пропил]-1Н-триазола, способствующим усилению дисперсионного взаимодействия с октадецильными группами сорбента.

Для установления влияния на сорбцию производных 1,2,4-триазола отдельных физико-химических параметров молекул графическим методом получены корреляционные уравнения и значения коэффициента детерминации R^2 (Приложение 1). Из результатов следует, что наибольший вклад в удерживание на поверхности ОДС вносят поляризуемость, объём и площадь поверхности молекул, поскольку значения коэффициента корреляции находятся в диапазоне значений от 0,55 до 0,99. При этом прослеживается зависимость между влиянием физико-химических параметров на удерживание от состава элюента. На рисунке 3.1 приведён график, показывающий изменение коэффициента детерминации для уравнений зависимости фактора удерживания производных 1,2,4-триазола на поверхности ОДС, полученных при различных соотношениях растворителей, от каждого физико-химического параметра молекул.

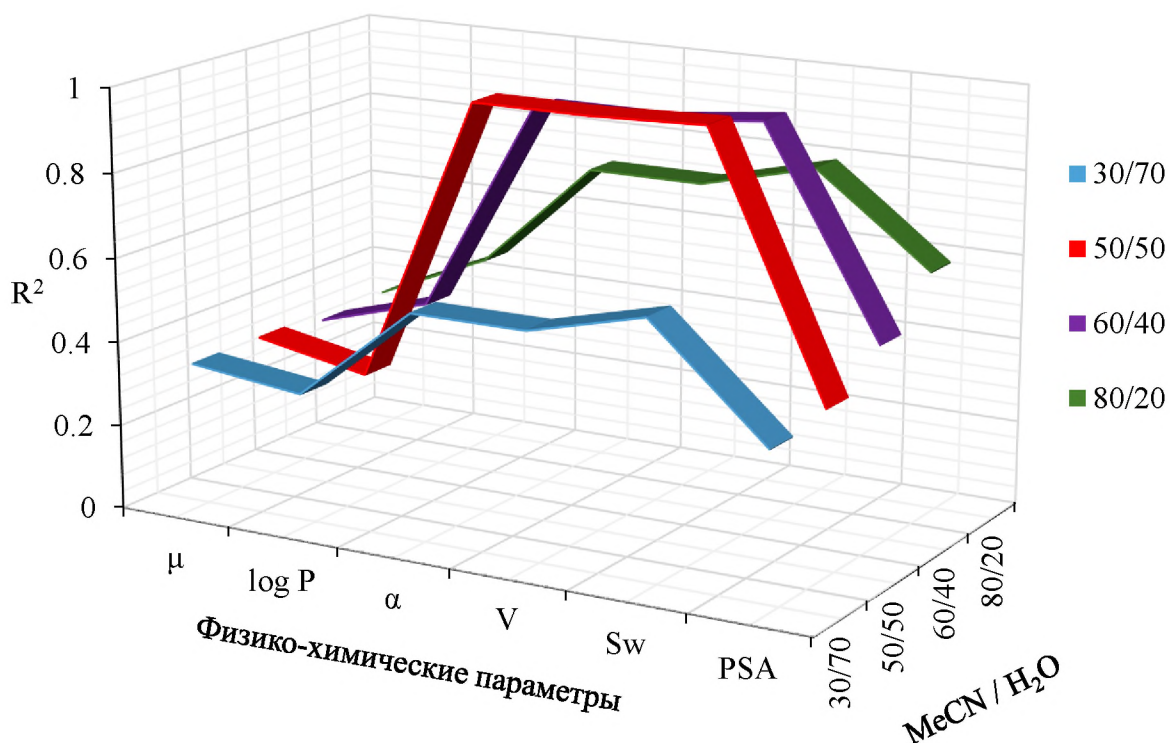


Рис. 3.1 График зависимости коэффициента детерминации уравнений, связывающих факторы удерживания производных 1,2,4-триазола на ОДС, полученные при различных составах элюента, с физико-химическими параметрами молекул

Из представленной диаграммы следует, что максимальное влияние на удерживание на поверхности ОДС оказывают объём, площадь поверхности и поляризуемость молекул в диапазоне концентрации ацетонитрила от 50 до 80 %. При изменении состава в сторону дальнейшего уменьшения или увеличения содержания органического модификатора вклад этих параметров будет постепенно нивелироваться. Так, например, уже при 30%-ой концентрации ацетонитрила вклад этих параметров упал практически в 2 раза (коэффициент детерминации составляет $\sim 0,5$), что может свидетельствовать об изменении межмолекулярных взаимодействий «сорбат – элюент» и «сорбент – элюент».

Исходя из общих представлений о сорбции органических соединений на поверхности пористого графитированного углерода, можно ожидать, что большие коэффициенты удерживания будут характерны для плоских молекул, имеющих в структуре π -орбитали кратных связей. При наличии в

структуре объёмных заместителей, молекула приближается к поверхности сорбента на меньшее расстояние, следовательно, удерживание будет слабее.

На рисунке 3.2 показан порядок выхода исследованных производных 1,2,4-триазола из колонки, заполненной пористым графитированным углеродом, при элюировании водно-ацетонитрильным раствором (50/50 % (об.)).

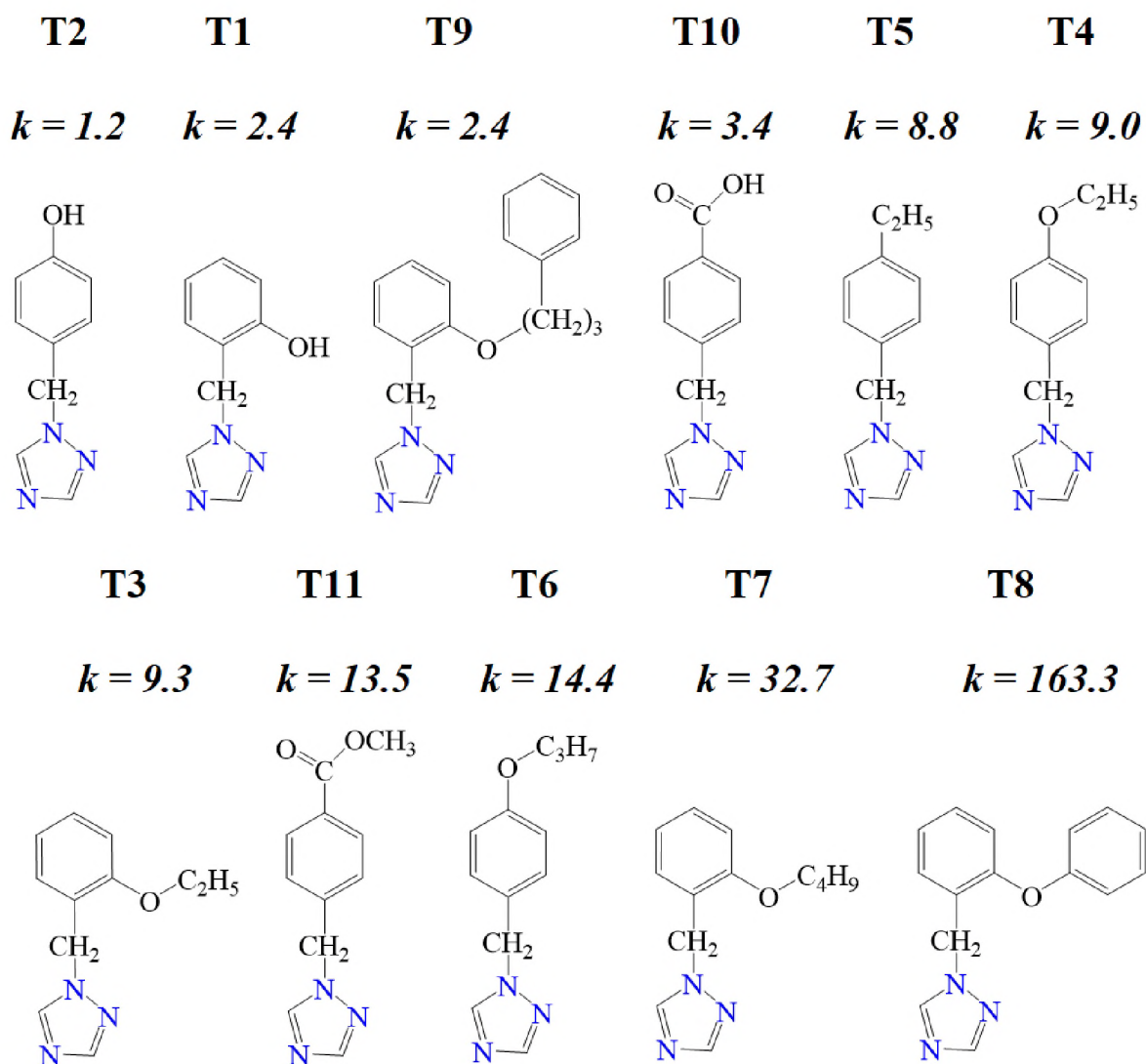


Рис. 3.2 Порядок элюирования и значения факторов удерживания производных 1,2,4-триазола на ПГУ (элюент: ацетонитрил – вода 50/50 % (об.), объёмная скорость потока $F = 250$ мкл/мин, $T_c = 40^\circ\text{C}$)

Как и ожидалось, соединения, имеющие гидроксильные (T1 и T2) и карбоксильную (T10) группы, элюируются первыми, поскольку сила межмолекулярных взаимодействий с растворителем выше. Блокировка функциональной группы углеводородным заместителем приводит к подавлению возможности образования ассоциатов с молекулами

растворителя за счёт водородных связей и, соответственно, усилению адсорбции. Так, например, разница между факторами удерживания карбоновой кислоты (**T10**) и её метиловым эфиром (**T11**) в указанных условиях элюирования равна 10, а селективность разделения $\alpha_{\text{разд.}} \sim 4$. Такое существенное отличие в сорбционных характеристиках можно объяснить с термодинамической точки зрения: энергия образования водородных связей между молекулами воды и карбоксильными группами в пределах 15...20 кДж/моль, а между молекулами воды и карбонильными группами – 4...6 кДж/моль, усреднённая разница между этими значениями также ~ 4 [200].

В числе слабо сорбируемых соединений также оказалось вещество **T9**, имеющее наибольший объём молекулы в ряду производных 1,2,4-триазола. Стерические препятствия, возникающие в случае присоединения бензопропильного радикала к 1-[2-бензилокси]-1H-триазолу в *орто*-положении, снижают площадь контакта молекулы с поверхностью сорбента и, как следствие, общее время удерживания.

Введение в структуру гетероцикла линейных углеводородов (**T3 - T7**) приводит к росту удерживания по мере увеличения длины углеводородного радикала, что также коррелирует с изменением физико-химических параметров молекул. Однако при сравнении сорбционных характеристик гомологов **T8** и **T9**, отличающихся на длину углеводородной цепи в заместителе, видна обратная зависимость: с ростом углеродной цепи между ароматическими фрагментами молекул время удерживания соединений на поверхности ПГУ уменьшается. Можно предположить, что это связано не столько с изменением физико-химических параметров молекул, сколько с их пространственным строением, а именно ориентацией фрагментов адсорбируемых молекул относительно поверхности неподвижной фазы. При росте углеводородной цепи с насыщенными связями возрастает конформационная подвижность молекулы, следовательно, вероятность нахождения всех ароматических фрагментов в производных 1,2,4-триазола **T8** и **T9** в одной плоскости будет снижаться по мере удлинения цепи между бензольными кольцами.

3.2.2 Адсорбция производных урацила в условиях обращённо-фазовой жидкостной хроматографии

Анализ сорбционного поведения производных урацила, отличающихся структурой заместителей и числом гидроксциклопентеновых фрагментов проводился с применением метода ОФ ВЭЖХ. В ходе исследования получены значения фактора удерживания на октадецилсиликагеле, цианопропилсиликагеле и пористом графитированном углероде из водно-ацетонитрильного элюента с добавлением 0.1% муравьиной кислоты (табл. 3.9).

Таблица 3.9. Значения фактора удерживания производных урацила на поверхности октадецилсиликагеля, цианопропильной неподвижной фазы и пористого графитированного углерода (содержание ацетонитрила и воды 50/50 % (об.), $T = 313\text{ K}$)

Соединение	k		
	ПГУ	CN-силикагель	ОДС
У 1	3.67	0.08	-
У 2	1.25	0.38	-
У 3	2.17	0.29	0.47
У 4	7.58	0.67	0.71
У 5	5.33	0.96	-
У 6	3.75	8.42	0.62
У 7	3.92	0.33	0.61
У 8	10.25	0.96	1.11
У 9	9.67	1.33	2.15
У 10	9.42	0.92	0.84
У 11	22.75	1.38	1.13
У 12	2.42	2.29	2.90

Адсорбция производных урацила на всех исследованных сорбентах существенно различается, при этом соединения можно сгруппировать по значениям фактора удерживания. Так, хуже всего исследуемые производные урацила разделяются на колонке, заполненной октадецилсиликагелем: фактор удерживания соединений **У3**, **У4**, **У6**, **У7** и **У10** меньше 1, а для гетероциклов **У8**, **У9**, **У11** и **У12** он находится в

диапазоне от 1 до 3. Увеличение содержания воды не окажет существенного влияния на селективность разделения, однако это приведёт к росту давления на входе в колонку и окажет негативное влияние на состояние неподвижной фазы, которое проявляется в потере смачиваемости частиц сорбента и падении эффективности колонки.

Использование цианопропильной фазы также не продемонстрировало высокой селективности разделения производных урацила. Низкие значения фактора удерживания (менее 1) получены для соединений **У1** – **У5**, **У7**, **У8**, **У10**. Соединения **У9** и **У11**, имеющие одинаковые 4-(трет-бутил)фенильные заместители, но отличающиеся типом гетероатомов, соединяющих их с фрагментом урацила, практически не разделяются в данных условиях элюирования: значения фактора удерживания составляют 1.33 и 1.38 соответственно.

Дольше остальных производных урацила на поверхности цианопропильной фазы удерживаются соединения **У12** и **У6**, содержащие 4-гексилфенильный и 4-хлорфенильный заместители (значения факторов удерживания составили 2.29 и 8.42 соответственно). Такое поведение может объясняться проявлением индукционных эффектов, так как атом хлора (**У6**) вызывает смещение электронной плотности, что способствует изменению энергии адсорбции. При этом производное урацила с подобной структурой, содержащее два гидроксциклопентеновых заместителя (**У10**), удерживается на поверхности сорбента значительно слабее, что может быть обусловлено влиянием дополнительной гидроксильной группы, образующей водородные связи с молекулами воды в элюенте.

Для соединения **У12** удерживание на поверхности цианопропильной фазы оказывается несколько выше, чем для большинства исследуемых производных урацила, поскольку наличие линейного алкильного заместителя способствует увеличению гидрофобной поверхности молекулы и росту дисперсионных сил. Однако конкурентное взаимодействие с элюентом приводит к тому, что при соотношении ацетонитрила и воды в элюенте 50/50 % об. фактор удерживания составляет 2.29.

Более эффективное разделение производных урацила достигается при использовании колонки, заполненной пористым графитированным углеродом. Удерживание гетероциклических соединений на поверхности

данного сорбента определяется совокупностью различных межмолекулярных сил: дисперсионных, электростатических, индукционных, специфических, таких как π - π -взаимодействия. Особенности геометрического строения, заключающиеся в соединении циклических, в том числе ароматических, молекулярных фрагментов через углерод-углеродные или углерод-азотные связи, оказывают значительное влияние на сорбционное поведение исследуемых производных урацила. Возникающая при таком строении конформационная подвижность молекул позволяет им ориентироваться над поверхностью сорбента наиболее выгодным образом, при котором взаимодействия типа «адсорбат – адсорбент» будут сильнее конкурентных «элюент – адсорбент».

Анализ производных урацила, отличающихся числом гидроксциклопентеновых заместителей, показал, что их порядок элюирования из колонки, заполненной ПГУ, не зависит от числа этих фрагментов и определяется лишь структурой заместителя, находящегося в 5-ом положении урацила (рис. 3.4).

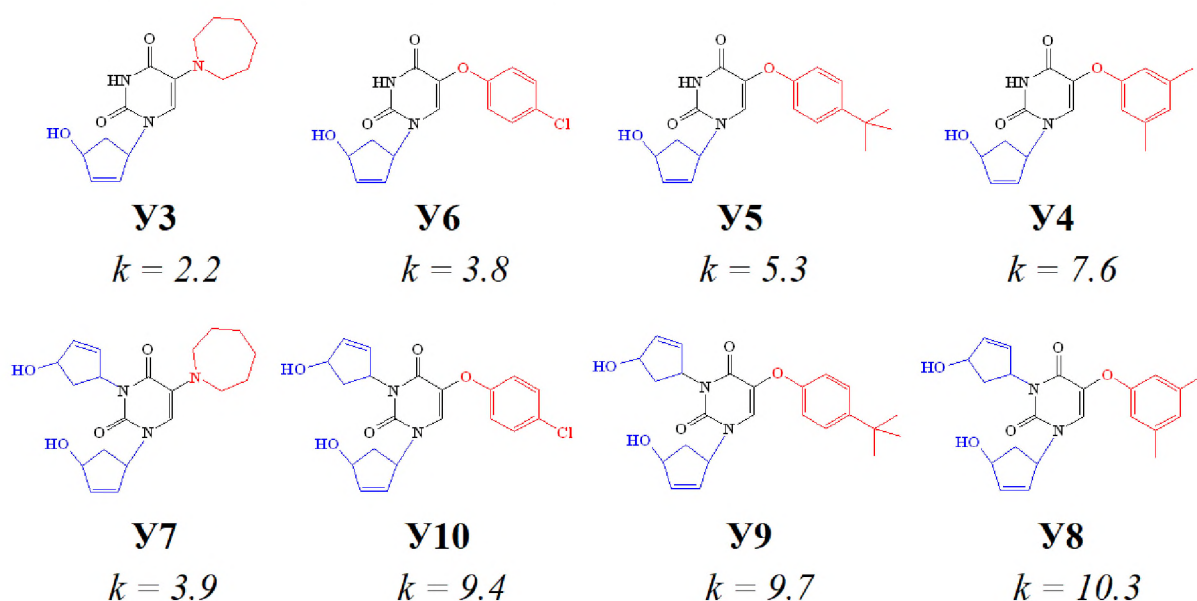


Рис. 3.3 Порядок элюирования и значения факторов удерживания производных урацила на ПГУ (элюент: ацетонитрил – вода 50/50 % (об.), объёмная скорость потока $F = 250$ мкл/мин, $T_c = 40^\circ\text{C}$)

Также установлено, что введение в структуру соединений второго гидроксциклопентенового фрагмента приводит к увеличению значения фактора удерживания, что, вероятно, обусловлено наличием кратной связи, способной взаимодействовать с π -электронной системой ПГУ.

При сравнении производных урацила, содержащих линейный заместитель с гидроксильной группой (соединения **У1** и **У2**) обнаружено, что производное **У2**, в структуре которого содержится циано-группа, элюируется первым. Это может быть связано с тем, что при использовании 0.1%-ой муравьиной кислоты в качестве модифицирующей добавки пиридин-содержащее производное **У1** в растворе протонируется, что приводит к проявлению у молекулы π -акцепторных свойств. При взаимодействии с поверхностью ПГУ в системе сорбат-сорбент возникает ион-индуцированное дипольное взаимодействие, приводящее к появлению в системе эффекта полярного удерживания на ПГУ [143]. Протонирование циано-группы в применяемых условиях протекает значительно хуже, поскольку атом азота находится в *sp*-гибридизации.

Таким образом, продемонстрировано, что удерживание азотсодержащих гетероциклических соединений на ПГУ зависит не только от структуры молекул, но также определяется значениями pH элюента.

3.2.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография флексимерных производных пиридина и пиримидина

С использованием метода ОФ ВЭЖХ исследованы сорбционные свойства флексимерных азотсодержащих соединений, имеющих в структуре два гетероциклических фрагмента, соединённых углерод-углеродной связью. При элюировании исследуемых соединений водно-ацетонитрильным раствором с добавлением 0.1%-ой муравьиной кислоты получены значения фактора удерживания на различных сорбентах: октацелсилликагеле, цианопропилсиликагеле и пористом графитированном углероде (табл. 3.10).

Таблица 3.10. Фактор удерживания флексимерных производных пиридина и пиримидина на поверхности октадецилсиликагеля, цианопропильной неподвижной фазы и пористого графитированного углерода (содержание ацетонитрила и воды 50/50 % (об.), $T_c = 313\text{ K}$)

Соединение	k		
	ПГУ	CN-силикагель	ОДС
П1	12.58	8.96	0.28
П2	5.67	8.96	0.17
П3	2.50	0.00	0.26
П4	1.67	0.00	0.15
П5	2.83	0.17	0.13
П6	4.92	0.13	0.17
П7	3.83	8.46	1.21
П8	2.75	0.25	-
П9	2.83	0.63	0.19

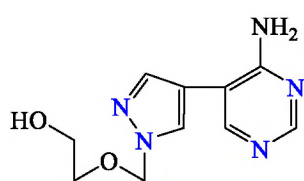
Из представленных данных видно, что для разделения соединений с подобной структурой наиболее подходящим сорбентом является пористый графитированный углерод, поскольку на силикагеле с привитыми фазами производные пиридина и пиримидина элюируются либо в районе мёртвого времени (на ОДС и CN-силикагеле), либо значения селективности практически не отличаются от 1 (**П1**, **П2**, **П7** на CN-силикагеле).

По результатам квантово-химических расчётов видно, что в указанном ряду структурно близких флексимерных производных пиридина и пиримидина все вещества характеризуются отрицательными значениями липофильности, следовательно, они гидрофильны. Наличие в структуре amino-, keto- и гидроксильных групп позволяет этим соединениям образовывать водородные связи с молекулами элюента, за счёт чего сила дисперсионных взаимодействий с поверхностью ОДС будет ослабевать.

При сорбции на цианопропильной фазе хорошее удерживание исследуемых гетероциклов может быть обусловлено тем, что соединения **П1** и **П2** содержат только полярные (амино- и keto-) функциональные группы, способные к образованию различных межмолекулярных (дисперсионных, ориентационных, индукционных, π - π -) взаимодействий и водородных связей с циано-группами.

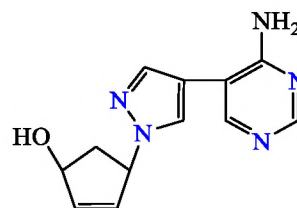
На поверхности ПГУ максимальное значение фактора удерживания характерно для 5-(1Н-пиррол-3-ил)пиримидин-4-амин (П1), имеющего максимальное значение дипольного момента. Структурно близкое производное пиримидина (П2) характеризуется меньшим значением дипольного момента, а время его элюирования снижено в 2 раза по сравнению с П1. Подобное различие в сорбции может быть обусловлено не только межмолекулярными взаимодействиями с элюентом, но и стерическим фактором, вызванным ориентацией пиррольного и пиримидинового колец относительно поверхности ПГУ. Для другой пары соединений (П4 и П5), отличающихся от П1 и П2 наличием линейного заместителя, наблюдается аналогичная связь между дипольным моментом и удерживанием. Внедрение в структуру флексимерного гетероцикла линейного заместителя способствует изменению конформационной подвижности молекулы и может приводить к изменению её ориентации относительно поверхности сорбента.

Внедрение в структуру циклического заместителя с кратной связью вместо линейного также приводит к росту удерживания за счёт возникновения межмолекулярных взаимодействий между π -электронными системами гетероцикла и пористого графитированного углерода. В качестве примера можно привести пару аминопроизводных пиримидина П4 и П6: 2-((4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол ($k = 1.67$) и 4-(4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)циклопент-2-ен-1-ол ($k = 4.92$) соответственно. Теоретически вычисленные значения липофильности согласуются с общими представлениями об их влиянии на сорбционные характеристики: чем меньше численное значение липофильности, тем более гидрофильно такое соединение, и, следовательно, оно быстрее элюируется из колонки. Наличие в структуре гетероцикла П6 лабильных углерод-углеродных связей позволяет циклическим фрагментам наиболее выгодно ориентироваться относительно поверхности ПГУ, способствуя усилению действия адсорбционных сил.



$$k(50:50) = 1.67$$

$$\log P = -1.22$$



$$k(50:50) = 4.92$$

$$\log P = -1.02$$

При отсутствии в структуре флексимерных производных гетероциклов функциональных групп и других заместителей число гетероатомов в цикле не оказывает существенного влияния на адсорбцию (рис. 3.3).

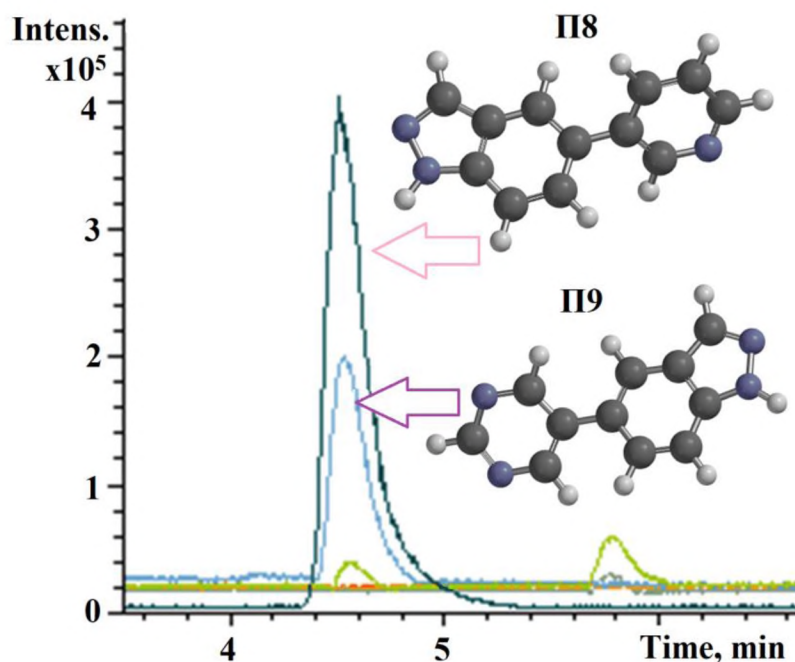


Рис. 3.4 Хроматограмма элюирования 5-(пиридин-3-ил)-1Н-индазола (**П8**) и 5-(пиримидин-5-ил)-1Н-индазола (**П9**) на ПГУ (элюент: ацетонитрил – вода 50/50 % (об.), объёмная скорость потока $F = 250$ мкл/мин, $T_c = 40^\circ\text{C}$)

Для подобных соединений значения большинства физико-химических параметров, характеризующих геометрическое строение, оказываются достаточно близкими (исключение составляют дипольный момент, липофильность и полярная площадь молекулы), вследствие чего такие структуры являются трудноразделимыми.

3.2.4 Построение корреляционных зависимостей между хроматографическими и расчетными физико-химическими параметрами молекул производных урацила и флексимерных производных пиримидина

Физико-химические и топологические параметры молекул производных урацила, представленные в таблицах 3.2 и 3.5, были использованы для получения корреляционных уравнений в рамках модели «структура-свойство», с целью установления количественной связи между строением молекул и удерживанием в условиях ОФ ВЭЖХ. В общем виде такая зависимость представляется уравнением (16):

$$\lg k = \sum_{i=1}^n a \cdot D_i + b \quad (16)$$

где $\lg k$ – зависимая переменная, обозначающая фактор удерживания; D_i – молекулярный дескриптор исследуемого соединения (физико-химические, топологические и др. параметры, зависящие от строения молекулы); a – коэффициент регрессии; b – константа (свободный член регрессионного уравнения); n – число молекулярных дескрипторов, которые включены в модель.

Выбор дескрипторов, рассчитанных квантово-химическими методами, обусловлен свойствами молекул производных урацила, которые в большей степени оказывают влияние на адсорбционные характеристики. Современные вычислительные программы позволяют рассчитывать огромное количество параметров (программа *Mordred* способна рассчитать около 1800 различных дескрипторов), однако включение в выборку слишком большого числа параметров приводит к ложноположительным корреляциям вследствие переобучения модели. По этой причине были выбрано ограниченное число параметров.

Исследование влияния каждого дескриптора по-отдельности на удерживание продемонстрировало довольно слабую линейную корреляцию с коэффициентом детерминации R^2 не превышающим значения 0.4. Применение метода множественной линейной регрессии позволяет повысить качество модели, а также определить, какие из используемых

параметров вносят наибольший вклад в удерживание при их совместном использовании (табл. 3.11).

Таблица 3.11. Регрессионные уравнения зависимости удерживания производных урацила от некоторых молекулярных дескрипторов (значения фактора удерживания получены для ПГУ)

№	D_i	a	$p\text{-val}$	$F\text{-критерий}$	R^2
(17)	PBF	-0.091	0.21	0.01	0.99
	$TPSA$	0.001	0.06		
	$VSA_Estate1$	0.018	0.00		
	J	0.792	0.01		
	μ	0.001	0.81		
	$\log P$	0.034	0.03		
	α	0.026	0.08		
	V	-0.002	0.08		
	$Zag1$	0.002	0.07		
	b	-0.382	0.40		
(18)	PBF	-0.082	0.07	0.00	0.99
	$TPSA$	0.001	0.02		
	$VSA_Estate1$	0.018	0.00		
	J	0.795	0.00		
	$\log P$	0.035	0.01		
	α	0.027	0.02		
	V	-0.002	0.03		
	$Zag1$	0.002	0.00		
	b	-0.410			
(19)	$TPSA$	0.001	0.02	0.00	0.99
	$VSA_Estate1$	0.017	0.00		
	J	0.869	0.00		
	$\log P$	0.038	0.01		
	α	0.035	0.01		
	V	-0.003	0.02		
	$Zag1$	0.001	0.01		
	b	-0.922	0.06		

Примечание: PBF – дескриптор плоской формы молекулы, $TPSA$ – топологическая полярная площадь поверхности молекулы, $\text{\AA}^2$; $VSA_Estate1$ – гибридный индекс топологического состояния атомов; J – индекс

Балабана; μ – дипольный момент молекулы, Д; $\log P$ – липофильность; α – поляризуемость, $\text{\AA}^3$; V – объём молекулы, $\text{\AA}^3$; $Zag1$ – индекс Загреба; b – свободный член регрессионного уравнения; детерминации; *F-критерий* – критерий Фишера; R^2 – коэффициент детерминации.

Анализ статистической значимости полученных уравнений проводился с использованием критерия Фишера (*F-критерий*): модель считается статистически значимой, если значения данного критерия не превышают 0.05. Вклад каждого дескриптора в модель удерживания оценивается с помощью параметра *p-val*, который также не должен превышать пороговое значение, равное 0.05. Данный показатель оценивает вероятность случайного получения связи между рассматриваемыми в модели параметрами (порог ошибки составляет 5%) [201].

Регрессионные уравнения 18 и 19 получены путём последовательного исключения дескрипторов, для которых значения *p-val* превышали 0.05. Теоретически рассчитанные значения дипольного момента отличаются от истинных, поскольку в реальной хроматографической системе происходит конформационное вращение заместителей, приводящее к изменению вектора направленности дипольного момента [202].

Для флексимерных производных пиримидина также методом множественной линейной регрессии были получены корреляционные уравнения, описывающие связь структуры молекул и хроматографического удерживания (табл. 3.12).

Таблица 3.12. Уравнения множественной линейной регрессии зависимости удерживания флексимерных производных пиримидина от физико-химических параметров молекул (значения фактора удерживания получены для ПГУ)

№	Регрессионное уравнение	<i>F-критерий</i>	R^2
(20)	$\lg k = 0.095 \cdot \mu + 0.546 \cdot \log P - 0.081 \cdot \alpha + 5.167$	0.18	0.88
(21)	$\lg k = 0.150 \cdot V - 0.169 \cdot S_w + 0.086 \cdot PSA + 3.297$	0.01	0.99

Примечание: μ – дипольный момент молекул, Д; $\log P$ – липофильность; α – поляризуемость $\text{\AA}^3$; V – объём молекулы, $\text{\AA}^3$; S_w – площадь поверхности

молекулы, $\text{\AA}^2$; PSA – полярная площадь поверхности молекулы, $\text{\AA}^2$; F -критерий – критерий Фишера; R^2 – коэффициент детерминации.

Регрессионный анализ показал, что значения фактора удерживания наилучшим образом коррелируют с параметрами молекул, описывающих геометрическое строение молекул (уравнение 21). При включении в данные уравнения значений, полученных для производных пиридина обнаружено снижение коэффициентов детерминации. На основании полученных данных можно сделать вывод о высокой чувствительности прогностических моделей к структуре соединений, входящих в выборку. Следовательно, с целью получения уравнений, подходящих для прогнозирования удерживания в условиях жидкостной хроматографии ранее не исследованных этим методом гетероциклических соединений, необходимо предварительно получить значения для выборки веществ, содержащих указанный фрагмент.

Выводы по разделу 3.2

1. Адсорбция производный 1,2,4-триазола в условиях ОФ ВЭЖХ на поверхности ОДС определяется действием дисперсионных сил и напрямую зависит от структуры и положения заместителей. Согласно результатам квантово-химических расчётов, выполненных по методу ТФП с использованием гибридного обменно-корреляционного функционала B3LYP, и методов регрессионного анализа установлено, что наибольший вклад в удерживание на поверхности ОДС вносят такие физико-химические параметры, как поляризуемость, объём и площадь поверхности молекул, определяющие пространственную ориентацию заместителей и распределение электронов в молекуле.

2. Селективное разделение молекул производных азотсодержащих гетероциклов различного состава (1,2,4-триазола, урацила, флексимерных производных пиридина и пиримидина, являющихся аналогами нуклеозидов) достигается при использовании ПГУ, поскольку удерживание этого класса соединений на поверхности сорбента обусловлено проявлением гидрофобных π - π -взаимодействий между ароматическими

системами молекул-адсорбатов и π -электронной системой ПГУ. Структура заместителей (линейная и циклическая), их пространственное расположение относительно плоскости поверхности ПГУ определяют силу этих взаимодействий и являются ключевыми факторами, необходимыми для учёта при разработке аналитических методик разделения структурно-близких азотсодержащих гетероциклических соединений.

3. С применением методов квантовой-химии и регрессионного анализа получены корреляционные уравнения в рамках модели "структура-удерживание", а также оценён вклад в неё различных физико-химических и топологических параметров. Обнаружено, что для условий жидкостной хроматографии подобные модели оказываются очень чувствительны к структуре гетероцикла и могут применяться для прогнозирования сорбционного поведения соединений, находящихся в узком структурном ряду, определяемым строением гетероцикла.

3.3 Масс-спектрометрия исследуемых гетероциклических соединений

3.3.1 Выбор метода обнаружения и идентификации азотсодержащих гетероциклов

В жидкостной хроматографии существует возможность использования различных типов детекторов для регистрации сигнала элюируемого из колонки соединения. К числу наиболее часто используемых в химическом анализе детекторов относится спектрофотометрический, обладающий рядом положительных характеристик: высокая чувствительность, отсутствие деструкции регистрируемого соединения, что особенно полезно в препаративном варианте хроматографии. Поскольку азотсодержащие гетероциклические соединения и их производные обладают хромофорными группами, то спектрофотометрический детектор является наиболее подходящим средством регистрации сигнала в потоковом анализе. Однако этот вариант приемлем лишь в том случае, когда поставлена задача анализа известных соединений, либо существуют стандарты целевых компонентов, поскольку разделение смеси веществ неизвестного состава может привести к ошибочным результатам в идентификации, особенно если примесные компоненты также содержат хромофорные группы или элюируются одновременно с другими соединениями. Устранение подобных недостатков достигается с помощью высокоточных масс-спектрометрических приборов, осуществляющих регистрацию сигнала на основании данных о молекулярной массе соединения.

Ионизация в режиме электрораспыления (ИЭР) молекул является «мягким» методом и позволяет получать информацию о молекулярной массе соединения. Комбинация ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием в тандемном режиме, то есть с последующей фрагментацией ионов, даёт информацию о структурной формуле соединений, что способствует более достоверной их идентификации. Высокая чувствительность и селективность метода неоценима при анализе трудноразделимых соединений, именно поэтому для анализа структурно

близких азотсодержащих гетероциклов выбран масс-спектрометрический метод детектирования с ионизацией молекул в режиме ИЭР.

Применение существующих баз данных масс-спектров ограничено в случае использования жидкостной хроматографии, поскольку получаемые в ходе анализа спектры очень чувствительны к условиям их получения. При сравнении с базами данных для газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) они весьма невелики и оказываются мало информативными в случае идентификации новых органических соединений, в том числе впервые синтезированных.

Получение спектров тандемной масс-спектрометрии гетероциклических соединений и поиск характеристических ионов для структурно близких молекул является важным этапом исследований, направленных на упрощение процесса идентификации веществ, которые по ряду причин невозможно проанализировать методом ГХ-МС.

3.3.2 Фрагментация флексимерных производных пиридина и пиримидина в условиях тандемной масс-спектрометрии

Методом ВЭЖХ-МС-ИЭР в тандемном режиме с высоким разрешением проводился анализ флексимерных производных пиридина и пиримидина с определением m/z и брутто-формул фрагментных ионов. Результаты исследования представлены в таблице 3.13.

Таблица 3.13. Характеристика флексимерных производных пиридина и пиримидина методом ВЭЖХ-МС/МС-ИЭР (содержание ацетонитрила и воды 50/50 % (об.), сорбент – ПГУ, $T_c = 313\text{ K}$)

№	Ион-предшественник		Ион-продукт
	Брутто-формула	m/z , Да	Брутто-формула (m/z , Да)
П1	$C_8H_9N_4^+$	161.0834	$C_8H_6N_3^+$ (144.0667); $C_7H_8N_3^+$ (134.0724); $C_7H_5N_2^+$ (117.0455); $C_6H_7N_2^+$ (107.0612); $C_6H_4N^+$ (90.0343); $C_5H_6N^+$ (80.0499); $C_5H_3^+$ (63.0232); $C_4H_5^+$ (53.0388)

Продолжение таблицы 3.13

П2	$C_8H_8N_3O^+$	162.0675	$C_7H_8N_3^+$ (134.0725); $C_7H_5N_2^+$ (117.0458); $C_6H_7N_2^+$ (107.0613); $C_6H_6N^+$ (92.0497); $C_5H_6N^+$ (80.0499); $C_5H_3^+$ (63.0235); $C_4H_5^+$ (53.0389)
П3	$C_{11}H_{15}N_4O_2^+$	235.1221	$C_8H_{17}N_2O_2^+$ (173.0840); $C_8H_9N_4^+$ (161.0837); $C_8H_6N_3^+$ (144.0571); $C_7H_8N_3^+$ (134.0724); $C_7H_5N_2^+$ (117.0459); $C_6H_7N_2^+$ (107.0613); $C_6H_4N^+$ (90.0344); $C_6H_5^+$ (77.0388); $C_5H_3^+$ (63.0234)
П4	$C_{10}H_{14}N_5O_2^+$	236.1168	$C_8H_8N_5^+$ (174.0793); $C_7H_8N_5^+$ (162.0791); $C_7H_5N_4^+$ (145.0519); $C_6H_5N_4^+$ (133.0646); $C_6H_4N_3^+$ (118.0409); $C_5H_6N_3^+$ (108.0565); $C_5H_3N_2^+$ (91.0298); $C_4H_4N_2^+$ (80.0502); $C_3N_2^+$ (64.0185)
П5	$C_{10}H_{12}N_4O_3^+$	236.1179	$C_8H_6N_4O^+$ (174.0786); $C_7H_6N_4O^+$ (162.0789); $C_7H_5N_4^+$ (145.0539); $C_6H_5N_4^+$ (133.0649); $C_6H_4N_3^+$ (118.0410); $C_5H_6N_3^+$ (108.0575); $C_5H_4N_2^+$ (92.0499); $C_4H_5N_2^+$ (81.0454)
П6	$C_{12}H_{14}N_5O^+$	244.1223	$C_7H_8N_5^+$ (162.0790); $C_7H_5N_4^+$ (145.0525); $C_6H_5N_4^+$ (133.0649); $C_6H_4N_3^+$ (118.0411); $C_5H_6N_3^+$ (108.0567); $C_5H_3N_2^+$ (91.03); $C_4H_5N_2^+$ (81.0454)
П7	$C_{13}H_{15}N_4O^+$	243.1265	$C_8H_9N_4^+$ (161.0838); $C_8H_6N_3^+$ (144.0568); $C_8H_8N_2^+$ (132.0649); $C_8H_8N^+$ (118.0536); $C_7H_9N^+$ (107.0612); $C_5H_3N^+$ (77.0390)
П8	$C_{12}H_{10}N_3^+$	196.0884	$C_{12}H_9N^+$ (167.0741); $C_{11}H_7^+$ (139.0551); $C_9H_7^+$ (115.0549); $C_7H_5^+$ (89.0390); $C_5H_5^+$ (65.0387)
П9	$C_{11}H_9N_4^+$	197.0839	$C_{11}H_9N_2^+$ (169.0774); $C_{10}H_9N^+$ (143.0613); $C_9H_7^+$ (115.0549); $C_7H_5^+$ (89.0390); $C_5H_5^+$ (65.0389); $C_5H_3^+$ (63.0223)

В масс-спектрах исследованных гетероциклов присутствуют пики протонированных молекул состава $[M+H]^+$, а для соединения **П5** – катион-радикал состава $[C_{10}H_{12}N_4O_3]^+$.

При изучении влияния природы функциональных групп на фрагментацию обнаружено, что в случае их одинакового расположения в цикле в процессе фрагментации образуются протонированные молекулы, имеющие одинаковые значения m/z . На интенсивность фрагментных ионов,

вероятно, влияет природа гетероатома, входящего в функциональную группу, поскольку различия в электроотрицательности определяют внутримолекулярный перенос зарядов.

На рисунке 3.5 представлены масс-спектры фрагментных ионов двух производных пиримидина, содержащих amino- и кето-группу в 4-ом положении пиримидинового цикла, полученные методом ВЭЖХ-МС-ИЭР в тандемном режиме. Из полученных результатов следует, что при фрагментации протонированной молекулы аминопроизводного (**П1**) состава $[M+H]^+$ образуется ион-продукт состава $[C_8H_6N_3]^+$ с m/z 144.0667 Да за счёт элиминирования молекулы аммиака (m/z 17.0260 Да). Брутто-формула фрагментного иона установлена с использованием алгоритма SmartFormula, реализованного в ПО Bruker DataAnalysis. Альтернативный путь фрагментации иона-прекурсора связан с отщеплением нейтральной молекулы HCN (m/z 27.0110 Да), в результате чего получен ион состава $[C_7H_8N_3]^+$ с m/z 134.0724 Да. Установлено, что ион с таким же значением m/z (134.0725 Да) в случае молекулы **П2** образуется путём отщепления молекулы CO (m/z 27.9950 Да). Также на спектрах наблюдаются ионы с m/z равным 53, 63, 80, 107, 117 Да, следовательно, можно предположить, что процесс их образования формируются по общему для данных соединений принципу.

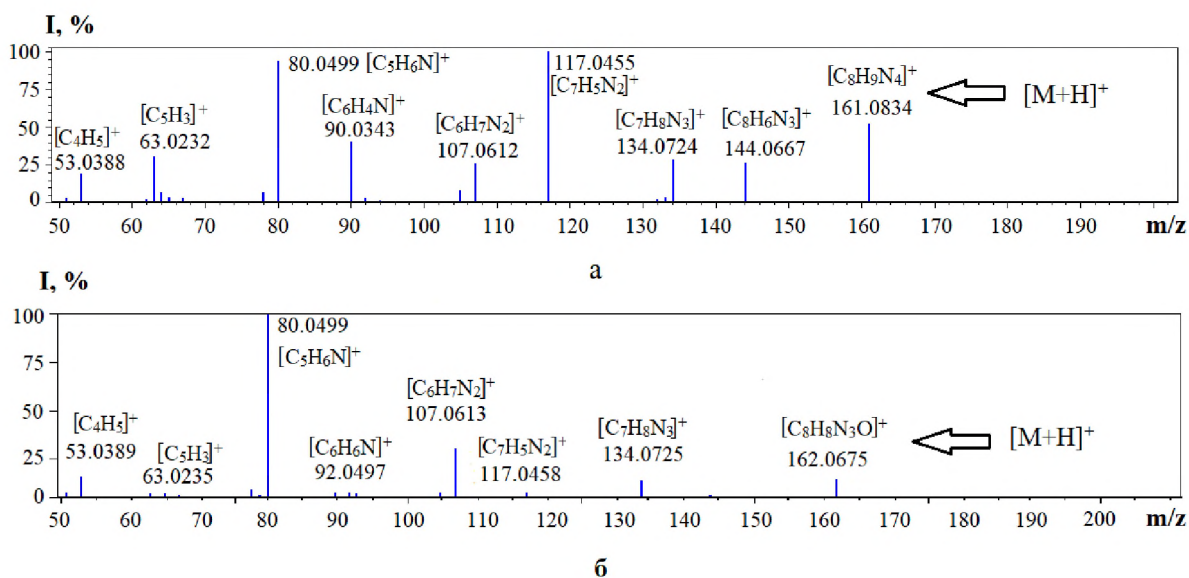


Рис. 3.5 Масс-спектр, полученный методом ВЭЖХ-МС-ИЭР в тандемном режиме, и брутто-формулы фрагментных ионов флексимерных производных пиримидина с различными функциональными группами: а) 5-(1Н-пиррол-3-ил)пиримидин-4-амин (**П1**); б) 5-(1Н-пиррол-3-ил)пиримидин-4(3Н)-он (**П2**)

В условиях тандемной масс-спектрометрии фрагментные ионы образуются за счёт отщепления от исходной протонированной молекулы нейтральных частиц. При этом возможны различные внутримолекулярные перегруппировки, вследствие чего в реальной системе высока вероятность существования фрагментных ионов с одинаковыми значениями m/z , но имеющих различное строение.

Исследование спектров фрагментации производных **П3-П7**, содержащих несколько функциональных групп, одна из которых присоединяется к линейному или циклическому заместителю, показало, что в выбранных условиях распад иона $[M+H]^+$ происходит посредством разрыва связи углерод-азот между пиразольным циклом и заместителем (рис. 3.6). В результате происходит элиминирование заместителей в виде нейтральных молекул 2-метоксиэтанола (для соединений **П3-П5**) и цикlopент-2-ен-1-ола (для соединений **П6, П7**) образуются ионы с m/z 161 и 162 Да, соответствующие протонированным молекулам 5-(1Н-пиразол-1-ил)пиримидин-4-амина, 3-(1Н-пиразол-4-ил)пиримидин-4 амина и 5-(1Н-пиразол-4-ил)пиримидин-4-5(Н)-она.

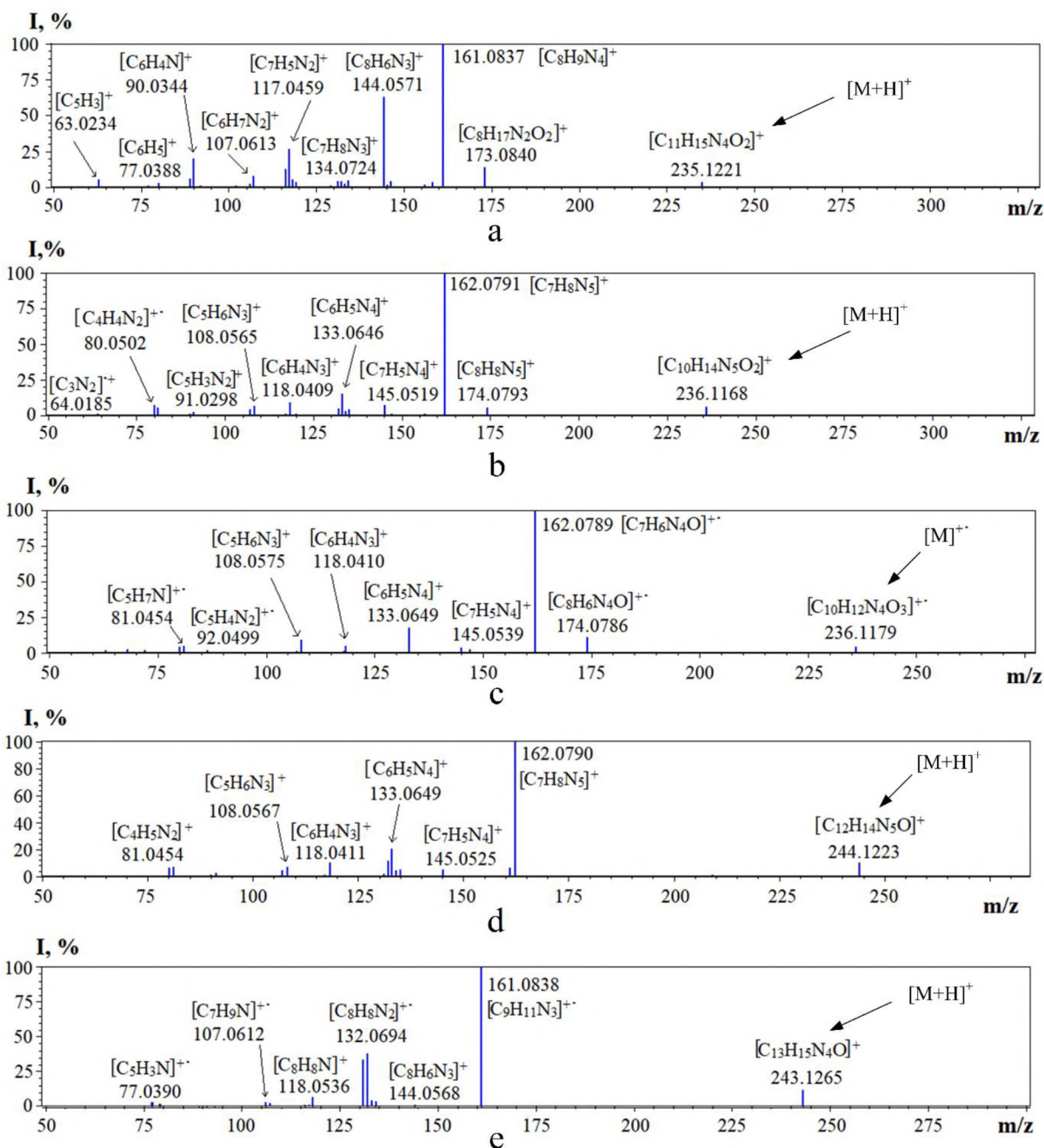


Рис. 3.6 Масс-спектры ионизации в режиме ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС и брутто-формулы фрагментных ионов флексимерных производных пиридина с линейными и циклическими заместителями: а) 2-((4-(2-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол (**П3**); б) 2-((4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол (**П4**); в) 5-(1-((2-гидроксиэтокси)метил)-1Н-пиразол-4-ил)пиримидин-4(3Н)-он (**П5**); д) 4-(4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил) циклопент-2-ен-1-ол (**П6**); е) 4-(4-(4-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол-1-ил) циклопент-2-ен-1-ол (**П7**).

Однако достоверная идентификация структурных формул ионов-продуктов затруднена, так как в молекулах после ионизации в газовой фазе могут протекать различные внутримолекулярные перегруппировки, в результате которых одному значению m/z может соответствовать несколько структур.

В случае фрагментации соединений, не содержащих функциональных групп и заместителей образуются спектры фрагментных ионов также имеющие одинаковые значения m/z (производные **П8** и **П9**, рис. 3.7).

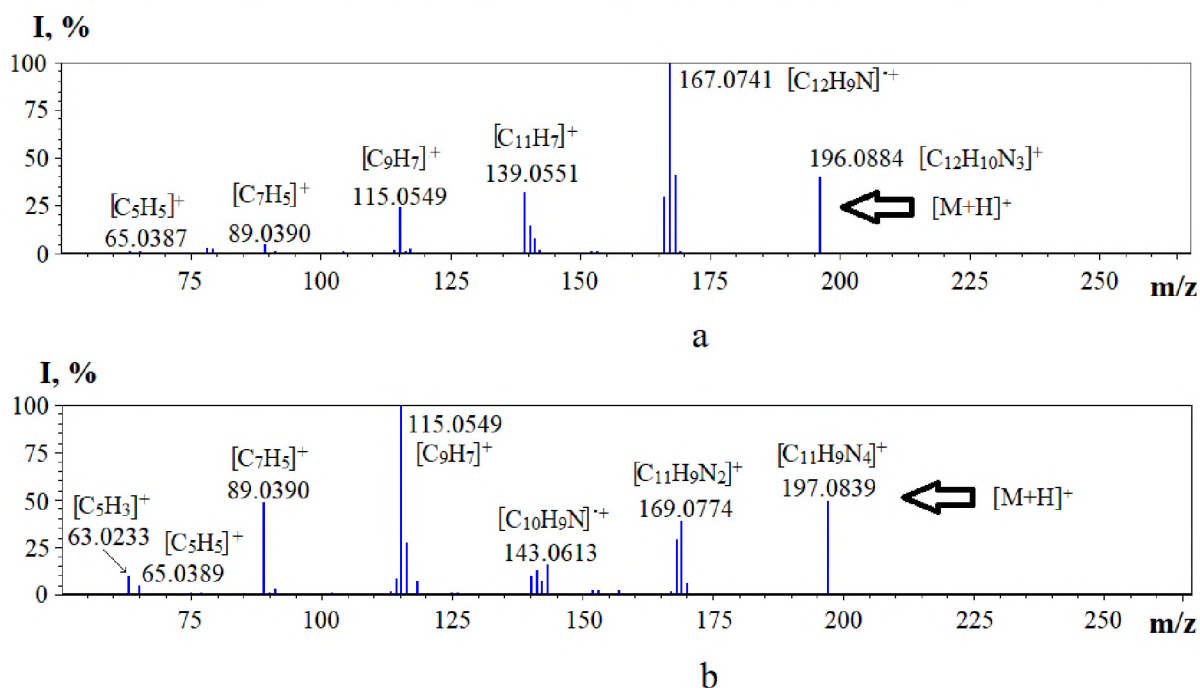


Рис. 3.7 Масс-спектры ионизации в режиме ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС и брутто-формулы фрагментных ионов флексимерных производных: а) 5-(пиридин-3-ил)-1Н-индазол; б) 5-(пиримидин-5-ил)-1Н-индазол

На основании полученных результатов масс-спектрометрического исследования были выделены наборы характеристических ионов (табл. 3.14), которые могут быть использованы для направленного поиска и идентификации структурно близких флексимерных аналогов нуклеозидов (производных пиридина и пиримидина) методом мониторинга множественных реакций (MRM).

Таблица 3.14 – Набор характеристических фрагментных ионов флексимерных производных пиридина и пиримидина, полученных методом ВЭЖХ-МС/МС (содержание ацетонитрила и воды 50/50 % (об.), сорбент – ПГУ, $T_c = 313\text{ K}$)

Соединение	Ион-прекурсор		Ион-продукт (m/z, Да)		
	Брутто-формула	m/z, Да	m/z, Да	m/z, Да	m/z, Да
П1	$[M+H]^+$	161.08	117.04^a	90.05	80.04
П2	$[M+H]^+$	162.07	134.07	107.06	80.04^a
П3	$[M+H]^+$	235.12	161.08^a	144.06	117.05
П4	$[M+H]^+$	236.12	162.08^a	133.06	118.04
П5	$[M+H]^+$	236.12	162.08^a	133.05	118.04
П6	$[M+H]^+$	244.12	162.08^a	133.05	118.04
П7	$[M+H]^+$	234.13	161.08^a	132.07	118.04
П8	$[M+H]^+$	196.09	167.07^a	139.05	115.05
П9	$[M+H]^+$	197.08	169.08	115.05^a	89.04

Примечание: ^a – ион для количественного определения.

В таблице жирным шрифтом выделены ионы-продукты с максимальной относительной интенсивностью в используемых условиях ионизации.

3.3.3 Определение мест протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина квантово-химическими методами

В условиях ионизации молекул электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов к молекулам анализируемых соединений присоединяется протон, вызывая в ней перераспределение электронной плотности. В результате при столкновении в соударительной ячейке масс-спектрометра с молекулами газа происходит распад протонированной молекулы на осколки, которые затем регистрируются детектором.

Исследуемые азотсодержащие гетероциклические производные пиридина и пиримидина содержат несколько атомов акцепторов, способных связываться с протоном в процессе ионизации. Определение мест

протонирования путём расчёта локального сродства к протону позволяет теоретически оценить направление фрагментации молекулы.

Для этой цели с помощью методов ТФП с использованием гибридного функционала B3LYP были рассчитаны некоторые энергетические характеристики и по уравнению (8) вычислено значение сродства к протону для флексимерных производных пиридина и пиримидина. В таблице 3.15 приведены энергетические характеристики для структур, имеющих максимальное значение сродства к протону.

Таблица 3.15. Энергетические параметры исследуемых флексимерных производных пиридина и пиримидина

№, п/п	Молекулярная форма	$E(\text{ВЗМО})$	$E(\text{НСМО})$	ΔE	ΔE_{Elec}°	ZPE	РА
П1	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4]$	-8.05	3.39	1103	-528.52	413.53	921
	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4+\text{H}]^+$	-10.02	-5.60	426	-528.96	451.18	
П2	$[\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}]$	-7.87	2.82	1031	-548.52	380.99	568
	$[\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}+\text{H}]^+$	-9.59	-6.45	302	-548.74	417.77	
П3	$[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]$	-5.56	-0.62	476	-796.93	660.86	453
	$[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2+\text{H}]^+$	-8.99	-5.05	380	-797.12	697.44	
П4	$[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2]$	-4.98	-1.49	336	-812.99	631.42	444
	$[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2+\text{H}]^+$	-9.55	-5.29	411	-813.18	668.81	
П5	$[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3]$	-6.02	-1.43	442	-832.72	606.42	870
	$[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3+\text{H}]^+$	-9.69	-5.12	440	-833.07	637.12	
П6	$[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}]$	-8.55	3.28	1141	-813.97	650.57	474
	$[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}+\text{H}]^+$	-9.52	-5.26	411	-814.16	689.41	
П7	$[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}]$	-8.33	3.59	1150	-792.90	679.91	520
	$[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}+\text{H}]^+$	-9.28	-5.10	403	-798.11	720.14	
П8	$[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3]$	-5.95	-1.10	467	-626.75	493.55	901
	$[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3+\text{H}]^+$	-9.88	-6.45	330	-627.11	529.99	
П9	$[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_4]$	-6.04	-1.29	458	-642.81	463.80	844
	$[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_4+\text{H}]^+$	-10.00	-6.72	316	-643.26	497.59	

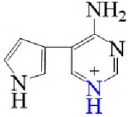
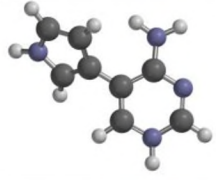
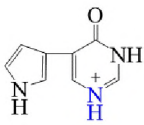
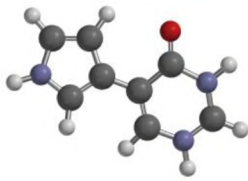
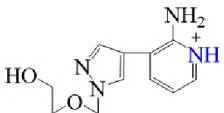
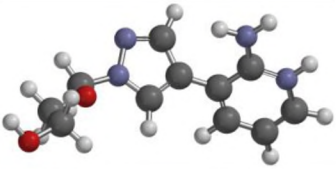
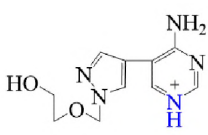
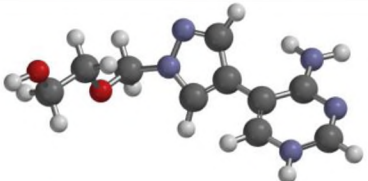
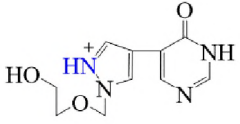
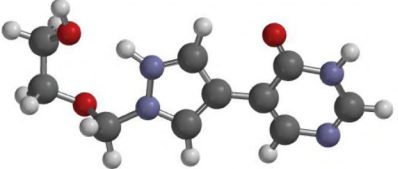
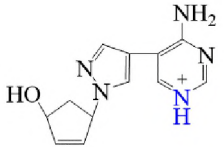
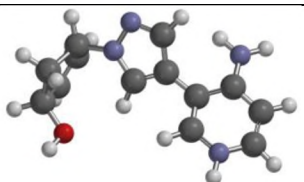
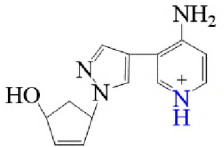
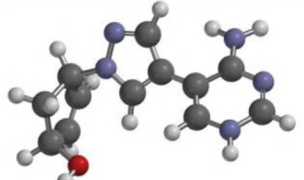
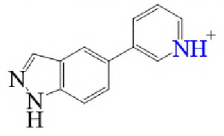
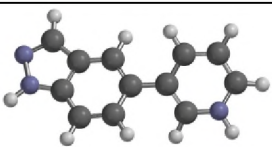
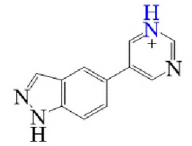
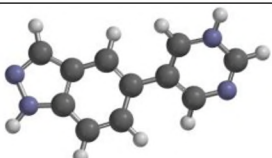
Примечание: энергии ВЗМО/НСМО – эВ, ΔE – кДж/моль, ΔE_{Elec}° – Хартри, ZPE – кДж/моль, $РА$ – кДж/моль.

Результаты вычислений сродства к протону для молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина позволяют разделить

исследуемые соединения на две группы. В первую группу, для которой значения $PA < 830$ кДж/моль, попадают соединения **П2-П4**, **П6**, **П7**. Для этой группы веществ характерны низкие значения основности, следовательно, сигнал протонированной молекулы состава $[M+H]^+$ в режиме регистрации положительных ионов методом ИЭР будет слабым. Остальные соединения относятся ко второй группе, для которой характерны более высокие значения PA , а, следовательно, и более интенсивные пики на масс-спектре. Полученные заключения полностью согласуются с экспериментальными данными, представленными на масс-спектрах указанных соединений (рис. 3.5-3.7).

Применение программного пакета *Spartan 14* позволяет исследователю самостоятельно выбирать место протонирования молекулы перед проведением расчёта. Следовательно, проверка каждого места протонирования осуществляется вручную и требует большого затратного времени. Ускорить процедуру поиска подходящей структуры можно за счёт предварительного использования программного пакета *CREST* (Conformer–Rotamer Ensemble Sampling Tool), созданного для осуществления конформационного анализа сложных структур. Поиск вероятных мест протонирования проводился с использованием вычислительного алгоритма Фостера-Бойса, позволяющего трансформировать делокализованные молекулярные орбитали в локализованные, а затем вычислять их координаты. Оптимизация геометрий протонированных изомеров проводилась с использованием полуэмпирического метода в приближении сильной связи (хТВ), в результате стерически невозможные варианты структур отсеивались. Далее к полученным изомерам применялся метод теории функционала плотности и вычислялись энергетические параметры. Положения зарядов в протонированных молекулах представлены в таблице 3.16.

Таблица 3.16. Места протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина, определенные с применением программы *CREST*

№, п/п	2D-Структурная формула $[M+H]^+$	3D-Структурная формула $[M+H]^+$	ΔE , кДж/моль
П1			319
П2			256
П3			329
П4			309
П5			305
П6			318
П7			352
П8			282
П9			244

Другие атомы азота, находящиеся в структуре колец, как и гетероатому функциональных групп, также способны выступать в роли акцепторов протона. Однако такие структуры будут менее устойчивы с термодинамической точки зрения, следовательно, такие протонированные молекулы будут фрагментироваться.

Таким образом, проведённое исследование демонстрирует положительную тенденцию в совместном использовании расчётных квантово-химических и экспериментальных масс-спектрометрических методов исследования структурно близких азотсодержащих соединений.

3.3.4 Определение новых пиридиновых стильбенов методом ВЭЖХ-МС-ИЭР

Подобранный метод хромато-масс-спектрометрического исследования был успешно применён для идентификации впервые синтезированных пиридинсодержащих E/Z-изомерных стильбенов, полученных методом сверхбыстрой фотоорганокаталитической изомеризации.

Азостильбены, например, пиридинсодержащие, являясь аналогами природных соединений способны к проявлению различной биологической активности (цитокинетическую, кардиопротекторную) [203]. Однако свойства цис- и транс-изомеров различаются: транс-аналоги термодинамически более устойчивы, однако в качестве лекарственных препаратов они не могут использоваться. По этой причине возникает необходимость разработки методик направленного синтеза цис-изомеров (Z-стильбенов). Фотоорганокаталитический метод E $\rightarrow$ Z-изомеризации стильбенов в проточном режиме является энергоэффективным и экономичным за счёт возможности использования минимального количества катализатора.

Синтезированные Z-изомеры пиридинсодержащих стильбенов были исследованы различными методами, подтверждающими их структуру.

Экспериментально установлено, что в режиме регистрации положительных ионов также, как и в случае флексимерных производных

пиридина и пиримидина, образуются протонированные молекулы состава $[M+H]^+$.

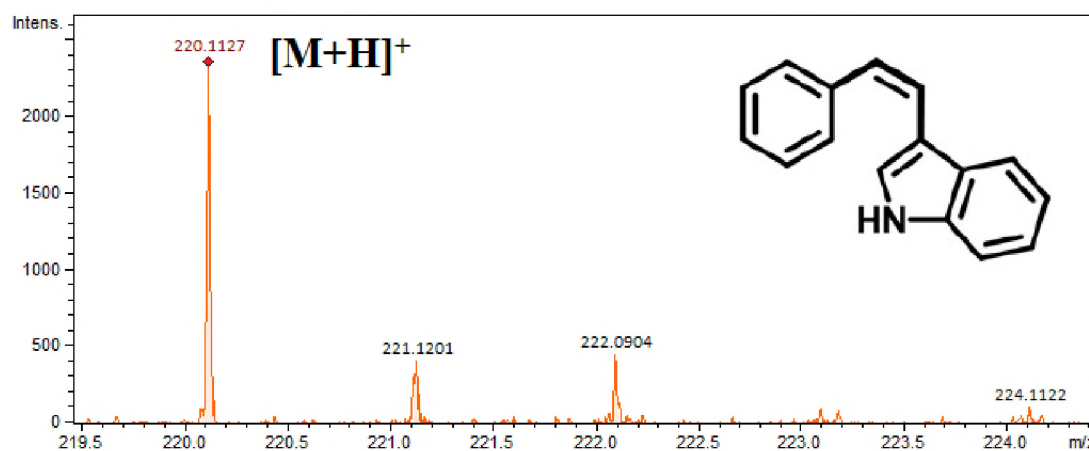


Рис. 3.8 Масс-спектр ионизации в режиме ВЭЖХ-ЭРИ-МС (Z)-3-стирил-1H-индола

На полученном спектре приведено изотопное распределение, соответствующее протонированной молекуле состава $[C_{16}H_{13}N+H]^+$.

(Z)-3-стирил-1H-индола может быть препаративно выделен из смеси с его (E)-изомером с использованием нормально-фазовой хроматографии при элюировании смесью этилацетата и циклогексана с соотношением 5/95.

Аналогичным образом был исследован димер (Z)-3-стирил-1H-индола (рис. 3.9).

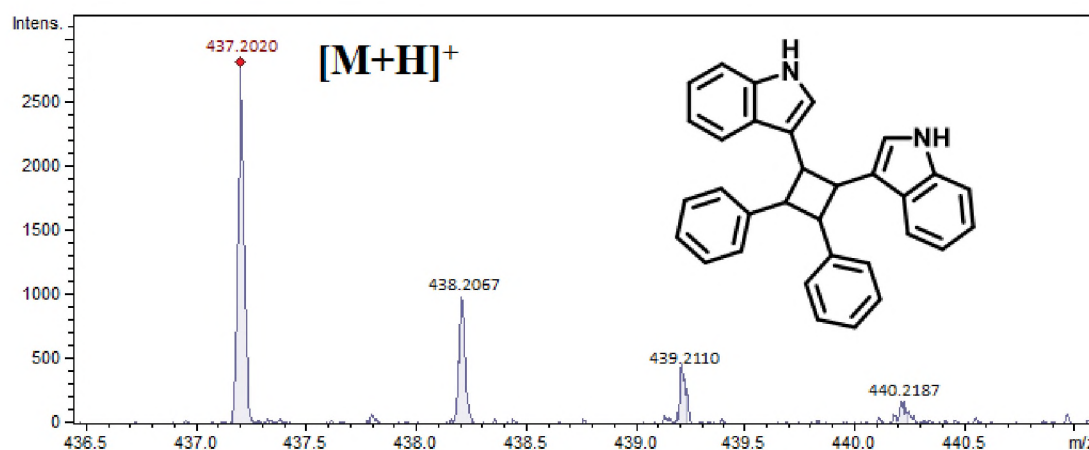


Рис. 3.9 Масс-спектр ионизации в режиме ВЭЖХ-ЭРИ-МС 3,3'-(3,4-дифенилциклобутан-1,2-диил)бис(1H-индол)

3.3.5 Оценка возможности комплексообразования флексимерных производных пиримидина с катионами металлов в условиях МАЛДИ

Азотсодержащие гетероциклические соединения находят своё применение не только в медицине в качестве лекарственных препаратов. Некоторые представители данного класса соединений применяются как эффективные ингибиторы коррозии благодаря возможности образовывать координационные связи с катионами металлов [204–206].

Медные изделия относятся к числу наиболее широко используемых в бытовых и промышленных целях, поскольку обладают прекрасной электропроводностью, легко поддаются механической обработке, а также низкой себестоимостью. Однако под воздействием окружающей среды, особенно в кислых средах, медь способна корродировать. С целью замедления данного процесса на поверхность изделий или в растворы добавляют вещества, способные замедлить этот процесс (ингибиторы коррозии). Производные пиримидина, 1,2,4-триазола и др. азотистые гетероциклические соединения проявляют хорошие антикоррозионные свойства и демонстрируют необходимость дальнейшего их изучения в этом направлении.

С помощью метода времяпролётной матричной активированной лазерной десорбции/ионизации – масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) исследованы комплексные и кластерные ионы, образованные флексимерными производными пиримидина (**П1** и **П2**). Указанные соединения выбраны объектами исследования по причине отсутствия заместителей, экранирующих гетероциклические фрагменты или функциональные группы. В качестве матрицы, улучшающей ионизацию целевых соединений, использовалась 2,5-дигидроксibenзойная кислота.

Исследуемые гетероциклы смешивались с раствором сульфата меди, куда затем добавляли матрицу и перемешивали раствор. Полученный раствор наносили на стальную плашку и оставляли сушиться на воздухе до полного удаления растворителя.

Ионизация методом MALDI-TOF MS полученных растворов показала, что в данных условиях, в отличие от метода ВЭЖХ-МС-ИЭР, молекулы гетероциклов связываются с катионами меди с образованием аддуктов натрия и калия (рис. 3.9).

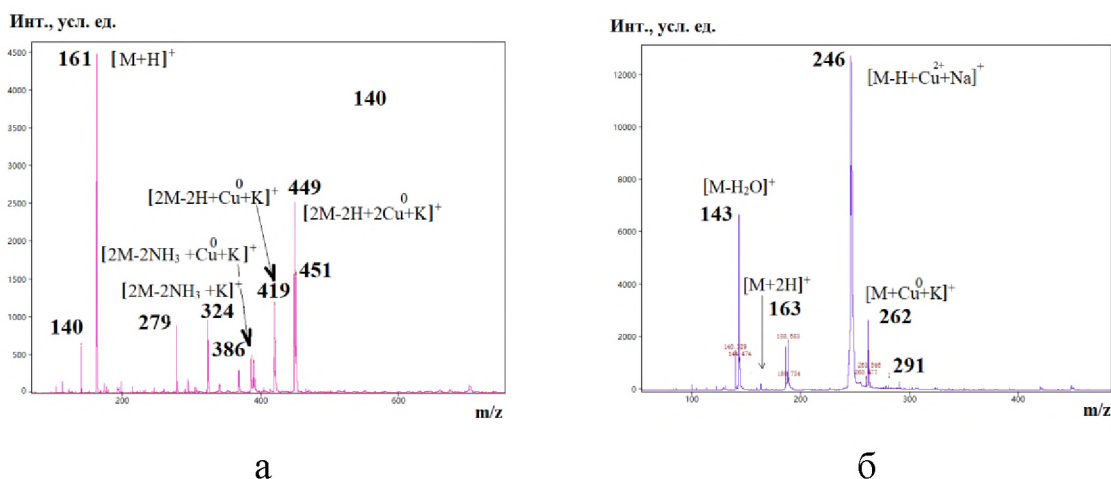


Рис. 3.10 Масс-спектры комплексных ионов меди флексимерными производными пиримидина: а) 5-(1Н-пиррол-3-ил) пиримидин-4-амин; б) 5-(1Н-пиррол-3-ил) пиримидин-4(3Н)-он.

При рассмотрении масс-спектров установлено наличие комплексных ионов состава $[2M-2NH_3 + Cu^0 + K]^+$ (386 Да), $[2M-2H + Cu^0 + K]^+$ (420 Да) и $[2M-2H^+ + 2Cu^0 + K]^+$ (449 Да) для производного **П1**. Для соединения **П2** получены масс-спектры содержащие ионы состава $[M-H + Cu^{2+} + Na]^+$ (246 Да) и $[M + Cu^0 + K]^+$ (262 Да). Состав ионов определен при помощи программы IsoPro версии 3.0.

Следует отметить, что образование описанных ионов сопровождается элиминированием аминогруппы или протона от молекулы гетероцикла вследствие лазерно-индуцированной фрагментации.

Выводы по разделу 3.3

1. Методом ВЭЖХ-МС-ИЭР получены масс-спектры новых флексимерных производных пиридина и пиримидина. Исследованы процессы фрагментации молекул гетероциклов в тандемном режиме, в результате чего были получены наборы характеристических ионов, которые могут использоваться при идентификации структурно близких соединений методом MRM.

2. С использованием методов ТФП рассчитаны энергетические характеристики молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина для нейтральных и протонированных форм. Рассчитаны значения сродства к протону, а также определены наиболее вероятные места протонирования молекул, существующих в газовой фазе.

3. Методом МАЛДИ исследованы комплексные ионы, образованные производными пиримидина с медью.

Заключение

Проведено комплексное исследование сорбционного поведения азотсодержащих гетероциклических соединений (производных 1,2,4-триазола, урацила, пиридина и пиримидина) в условиях ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения на различных сорбентах. Исследовано влияние структуры заместителей на сорбционные характеристики гетероциклических производных на поверхности ПГУ с применением квантово-химических методов теории функционала плотности. С помощью регрессионного анализа получены корреляционные уравнения для прогнозирования фактора удерживания по физико-химическим и топологическим молекулярным параметрам, характеризующим строение производных пиримидина и урацила, а также показана высокая чувствительность выбираемых параметров к геометрии гетероциклических соединений. Определены наборы характеристических фрагментных ионов флексимерных производных пиридина и пиримидина, образующихся при столкновительной диссоциации после ионизации электрораспылением. Квантово-химическим методом теории функционала плотности определены наиболее вероятные места протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина, образующихся при ионизации в режиме электрораспыления в газовой фазе. Показаны возможные направления распада молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина.

В ходе работы сделаны следующие выводы:

1. Методом теории функционала плотности вычислены значения физико-химических параметров молекул производных 1,2,4-триазола,

урацила и флексимерных производных пиридина и пиримидина. Рассчитаны значения топологических индексов указанных соединений и проведён сравнительный анализ влияния структуры заместителей на физико-химические свойства молекул. Показано, что увеличение длины углеводородных заместителей, а также их замена на ароматические, приводит к росту не только геометрических параметров молекул (объём и площадь поверхности), но и значений поляризуемости, что способствует усилению дисперсионных взаимодействий с неполярными сорбентами.

2. Впервые экспериментально получены значения факторов удерживания производных 1,2,4-триазола, урацила, пиридина и пиримидина на различных сорбентах в условиях ОФ ВЭЖХ. Показано, что на поверхности ПГУ проявляется более высокая селективность разделения азотсодержащих гетероциклических соединений благодаря действию специфических и электростатических взаимодействий при элюировании водно-ацетонитрильным раствором с равным соотношением растворителей. Установлено, что введение в структуру исследуемых соединений ароматических заместителей способствует усилению адсорбции на поверхности ПГУ.

3. Методом множественной линейной регрессии получены корреляционные уравнения, позволяющие прогнозировать сорбционное поведение структурно близких флексимерных производных пиримидина и урацила. Продемонстрирована высокая чувствительность уравнений к молекулярным дескрипторам, характеризующим строение гетероциклов и геометрию входящих в состав заместителей.

4. Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением изучены флексимерные производные пиридина и пиримидина. Показаны возможные направления фрагментации и получены наборы характеристических ионов, позволяющие ускорить идентификацию структурно близких соединений с помощью метода мониторинга множественных реакций.

5. С помощью квантово-химического алгоритма Фостера-Бойса получены структуры с наиболее вероятными местами протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина, существующих в газовой фазе при ионизации электрораспылением.

Представлены рассчитанные методом теории функционала плотности значения сродства к протону для наиболее устойчивых форм протонированных молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина.

6. Подобраны условия хроматографического разделения и масс-спектрометрической идентификации структурно близких азотсодержащих гетероциклических соединений, содержащих фрагменты пиридина, пиримидина, пиррола, пиразола, индазола.

Список литературы

1. Holla, B.S. Studies on some N-bridged heterocycles derived from bis-[4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-yl] alkanes / Holla, B.S., Gonsalves R., Shenoy S. // *Il Farmaco*. – 1998. – Т. 53. – №. 8-9. – С. 574-578.
2. Prasad D.J. Synthesis and antimicrobial activities of some new triazolothiadiazoles bearing 4-methylthiobenzyl moiety / Prasad, D.J., Ashok, M., Karegoudar, P., Poojary, B., Holla, B.S., Kumari, N.S. // *European journal of medicinal chemistry*. – 2009. – Т. 44. – №. 2. – С. 551-557.
3. Ashok M. Convenient synthesis of some triazolothiadiazoles and triazolothiadiazines carrying 4-methylthiobenzyl moiety as possible antimicrobial agents / Ashok M., Holla B.S. // *J Pharmacol Toxicol*. – 2007. – Т. 2. – № 3. – С. 256–263.
4. Walczak K. Synthesis and anti-tuberculosis activity of N-aryl-C-nitroazoles / Walczak K., Gondela A., Suwiński J. // *European journal of medicinal chemistry*. – 2004. – Т. 39. – №. 10. – С. 849-853.
5. Amir M. Synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation activities of some new 2-[(2, 6-dichloroanilino) phenyl] acetic acid derivatives. / Amir M., Shikha K. // *European journal of medicinal chemistry*. – 2004. – Т. 39. – №. 6. – С. 535-545.
6. Almasirad A. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 2, 4-triazoles. / Imasirad, A., Tabatabai, S. A., Faizi, M., Kebriaeezadeh, A., Mehrabi, N., Dalvandi, A., Shafiee, A. // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2004. – Т. 14. – №. 24. – С. 6057-6059.
7. Masuda K. Synthesis of 3-morpholino-N-ethoxycarbonyl sydnonimine-5-14C (sin-10-14C). / Masuda K., Toga T., Hayashi N. // *Journal of Labelled Compounds*. – 1975. – Т. 11. – №. 2. – С. 301-304.
8. Holla, B.S. New bis-aminomercaptotriazoles and bis-triazolothiadiazoles as possible anticancer agents. / Holla, B.S., Poojary, K.N., Rao, B.S.,

- Shivananda, M.K. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – T. 37. – №. 6. – C. 511-517.
9. Holla B.S. Synthesis characterization and anticancer activity studies on some Mannich bases derived from 1, 2, 4-triazoles. / Holla, B. S., Veerendra, B., Shivananda, M. K., Poojary. // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier*. – 2003. – T. 38. – № 7–8. – C. 759–767.
 10. He Z.X. Discovery of 1, 2, 4-Triazole-3-thione derivatives as potent and selective DCN1 inhibitors for pathological cardiac fibrosis and remodeling. / Zhang-Xu He, Ge Gao, Hui Qiao, Guan-jun Dong, Zengyangzong Dan, Ya-lan Li, Yu-ruo Qi, Qian Zhang, Shuo Yuan, Hong-Min Liu, Jianzeng Dong, Wen Zhao, Li-Ying Ma // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – T. 67. – №. 21. – C. 18699-18723.
 11. Kakefuda A. Synthesis and pharmacological evaluation of 5-(4-biphenyl)-3-methyl-4-phenyl-1, 2, 4-triazole derivatives as a novel class of selective antagonists for the human vasopressin V1a receptor. / Kakefuda A., Suzuki T., Tobe, T., Tsukada, J., Tahara, A., Sakamoto, Sh., Tsukamoto S.-i. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2002. – T. 45. – №. 12. – C. 2589-2598.
 12. Belenichev I. The Influence of Basic Therapy and New Drugs on NO-Dependent Mechanisms of Cardiac Destruction in Chronic Heart Failure. / Belenichev, I., Popazova, O., Goncharov, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Semenov, D., Oliynyk, S., Petakh, P., Kamyshnyi, O. // *Biomedicines*. – 2026. – T. 14. – №. 5. – C. 1018.
 13. Semenets A.P. Synthesis, docking, and biological evaluation of novel 1-benzyl-4-(4-(R)-5-sulfonylidene-4, 5-dihydro-1H-1, 2, 4-triazol-3-yl) pyrrolidin-2-ones as potential nootropic agents. / Semenets, A.P., Suleiman, M.M., Fedosov, A.I., Shtrygol, S.Y., Havrylov, I.O., Mishchenko, M.V., Kovalenko, S.M., Perekhoda, L.O. // *European journal of medicinal chemistry*. – 2022. – T. 244. – C. 114823.
 14. Sirakanyan S.N. New triazole-based hybrids as neurotropic agents. / Sirakanyan, S.N., Spinelli, D., Geronikaki, A., Hakobyan, E.K., Petrou, A.,

- Kartsev, V.G., Yegoryan, H.A., Paronikyan, E.G., Zuppiroli, L., Jughetsyan, H.V., Paronikyan, R.G., Arakelyan, T.A., Hovakimyan, A.A. // RSC Adv. The Royal Society of Chemistry, 2024. T. 14, № 45. C. 32922–32943.
15. Liao L. Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-triazole derivatives as potential neuroprotectant against ischemic brain injury. / Liao, L., Jiang, C., Chen, J., Shi, J., Li, X., Wang, Y., Wen, J., Zhoug, S., Liang J., Lao, Y., Zhang, J. // European journal of medicinal chemistry. – 2020. – T. 190. – C. 112114.
 16. Marzouk, M. A. Dual α -amylase and α -glucosidase inhibition by 1, 2, 4-triazole derivatives for diabetes treatment. / Marzouk, M.A., Mahmoud, E.M., Shehab, W.S., Fawzy, S. M., Mohammed, S. M., Abdel-Razek, M.A., Khedr, G.E., Elsayed, D.A. //Scientific Reports. – 2025. – T. 15. – №. 1. – C. 27172.
 17. Джилкрист Т. Химия гетероциклических соединений. Мир, 1996.
 18. Jagasia R. Peptide cyclization and cyclodimerization by CuI-mediated azide-alkyne cycloaddition. / Jagasia, R., Holub, J.M., Bollinger, M., Kirshenbaum, K., Finn, M.G. // J. Org. Chem. – 2009. – T. 74. – №. 8. – C. 2964.
 19. Huber D. 1,1'-Disubstituted ferrocenes as molecular hinges in mono-and bivalent dopamine receptor ligands. / Huber D., Hübner H., Gmeiner P. // J. Med. Chem. ACS Publications. – 2009. – T. 52. – №. 21. – C. 6860-6870.
 20. Leaver D.J. Synthesis and biological activity of sterol 14 α -demethylase and sterol C24-methyltransferase inhibitors. / Leaver D.J. // Molecules. MDPI. – 2018. – T. 23. – №. 7. – C. 1753..
 21. Daneshmend T.K., Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. / Daneshmend T.K., Warnock D.W. // Clin. Pharmacokinet. Springer, – 1988. – T. 14. – №. 1. – C. 13-34.
 22. Richardson K. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. Richardson, K., Cooper, K., Marriott, M.S., Tarbit, M.H., Troke, F., &

- Whittle, P. J. //Reviews of infectious diseases. – 1990. – T. 12. – №. Supplement_3. – C. S267-S271.
23. Myers R.S. Immunizing and Antimicrobial Agents, Chapter VI: Antifungal agents // Univ. Washington, MEDCH. – T. 401. – C. 1-16.
 24. Debruyne D. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. / Debruyne D., Ryckelynck J. P. //Clinical pharmacokinetics. – 1993. – T. 24. – №. 1. – C. 10-27.
 25. Dupont M.D.B. Itraconazole therapy in aspergillosis: study in 49 patients. / Dupont M.D.B. // J. Am. Acad. Dermatol. Elsevier. – 1990. – T. 23. – №. 3. – C. 607-614.
 26. Lestner J. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections. / Lestner J., Hope W. W. //Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2013. – T. 9. – №. 7. – C. 911-926.
 27. Sanati H. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. / Sanati, H., Belanger, P., Fratti, R., Ghannoum, M. // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1997. – T. 41. – №. 11. – C. 2492-2496.
 28. Kobayashi K. Breakthrough zygomycosis during voriconazole treatment for invasive aspergillosis. / Kobayashi, K., Kami, M., Murashige, N., Kishi, Y., Fujisaki, G., Mitamura, T. // Haematologica. – 2004. – T. 89. – №. 11. – C. ECR42-ECR42.
 29. Vigouroux S. Zygomycosis after prolonged use of voriconazole in immunocompromised patients with hematologic disease: attention required. / Vigouroux, S., Morin, O., Moreau, P., Méchinaud, F., Morineau, N., Mahé, B., Chevallier, P., Guillaume, T., Dubruille, V., Harousseau, J.-L., Milpied, N. //Clinical Infectious Diseases. – 2005. – T. 40. – №. 4. – C. e35-e37.
 30. Ritz N. Failure of voriconazole to cure disseminated zygomycosis in an immunocompromised child. / Ritz, N., Ammann, R. A., Aebischer, C. C., Gugger, M., Jaton, K., Schmid, R. A., Aebi, C. //European journal of

- pediatrics. – 2005. – T. 164. – №. 4. – C. 231-235.
31. Diekema D.J. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. / Diekema, D.J., Messer, S.A., Hollis, R.J., Jones, R.N., Pfaller, M.A. // *Journal of clinical microbiology*. – 2003. – T. 41. – №. 8. – C. 3623-3626.
 32. Roffey S.J. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. / Roffey, S. J., Cole, S., Comby, P., Gibson, D., Jezequel, S. G., Nedderman, A. N. R., Smith, D.A., Walker, D.K., Wood, N. // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2003. – T. 31. – №. 6. – C. 731-741.
 33. Scott L.J. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. / Scott L.J., Simpson D. // *Drugs*. – 2007. – T. 67. – №. 2. – C. 269-298.
 34. Perlin D.S. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. / Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruey-Izquierdo A. // *The Lancet infectious diseases*. – 2017. – T. 17. – №. 12. – C. e383-e392.
 35. Seyedmousavi S. Antifungal use in veterinary practice and emergence of resistance. / Seyedmousavi, S., Wiederhold, N. P., Ebel, F., Hedayati, M. T., Rafati, H. Verweij, P. E. // *Emerging and epizootic fungal infections in animals*. – Cham : Springer International Publishing, 2018. – C. 359-402.
 36. Klix M.B. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. / Klix M.B., Verreet J.-A., Beyer M. // *Crop protection*. – 2007. – T. 26. – №. 4. – C. 683-690.
 37. Dong F. Chiral triazole fungicide difenoconazole: absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. / Dong, F., Li, J., Chankvetadze, B., Cheng, Y., Xu, J., Liu, X., Li, Y., Chen, X., Bertucci, C., Tedesco, D., Zanasi, R., Zheng, Y. // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – T. 47. – №. 7. – C. 3386-

- 3394.
38. Dong B. Recent advances in the toxicological effects of difenoconazole: A focus on toxic mechanisms in fish and mammals. / Dong B. //Chemosphere. – 2024. – T. 368. – C. 143751.
 39. Dong B. A comprehensive review on toxicological mechanisms and transformation products of tebuconazole: Insights on pesticide management. / Dong B. //Science of The Total Environment. – 2024. – T. 908. – C. 168264.
 40. Teng M. Effect of propiconazole on the lipid metabolism of zebrafish embryos (*Danio rerio*). / Teng, M., Zhao, F., Zhou, Y., Yan, S., Tian, S., Yan, J., Meng, Z., Bi, S., Wang, C. //Journal of agricultural and food chemistry. – 2019. – T. 67. – №. 16. – C. 4623-4631.
 41. Gopinath K. Effect of propiconazole and difenoconazole on the control of anthracnose of chilli fruits caused by *Colletotrichum capsici*. / Gopinath K., Radhakrishnan N. V., Jayaraj J. //Crop Protection. – 2006. – T. 25. – №. 9. – C. 1024-1031.
 42. He Z. In silico, in vitro, and in vivo studies indicate the endocrine-disrupting effects of cyproconazole stereoisomers. / He, Z., Li, Y., Zhou, L., Li, R., Zhang, Y., Wang, Z., Wang, M. //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2024. – T. 72. – №. 44. – C. 24228-24236.
 43. Cao F. Developmental toxicity of the triazole fungicide cyproconazole in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). / Cao, F., Souders, C.L., Li, P., Pang, S., Qiu, L., Martyniuk, C.J. //Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – T. 26. – №. 5. – C. 4913-4923.
 44. Bushuieva I.V. Influence of the carrier type and surfactants on the trifuzole emission from veterinary intrauterine suppositorie. / Bushuieva, I.V., Klyosov, K.G., Parchenk, V.V., Gudzenko, O.P., Gutyj, B.V., Polova, Z. M., Olkhovska, A.B., Mykhailiuk, Y.O., Odyntsova, V. M.// – 2020.
 45. Wang A. Azocyclotin binds CDK4 to disrupt DNA methylation in Zebrafish epigenetic transgenerational inheritance. / Wang, A., Shi, S., Ma, Y., Li, S.,

- Zhu, W., Gui, W. //Environmental Science & Technology. – 2025. – T. 59. – №. 50. – C. 27130-27142.
46. Subbaraman R. 4,5-dicyano-1 H-[1, 2, 3]-triazole as a proton transport facilitator for polymer electrolyte membrane fuel cells. / Subbaraman R., Ghassemi H., Zawodzinski T.A. // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – T. 129. – №. 8. – C. 2238-2239.
 47. Subbaraman R. Triazole and triazole derivatives as proton transport facilitators in polymer electrolyte membrane fuel cells. / Subbaraman R., Ghassemi H., Zawodzinski Jr T. // Solid State Ionics. – 2009. – T. 180. – №. 20-22. – C. 1143-1150.
 48. Fumagalli M. Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases. / umagalli, M., Lecca, D., Abbracchio, M.P., Ceruti, S. //Frontiers in Pharmacology. – 2017. – T. 8. – C. 941.
 49. Micheli V. Neurological disorders of purine and pyrimidine metabolism. / Micheli, V., Camici, M., G Tozzi, M., L Ipata, P., Sestini, S., Bertelli, M., Pompucci, G. //Current topics in medicinal chemistry. – 2011. – T. 11. – №. 8. – C. 923-947.
 50. Tsesmetzis N. Nucleobase and nucleoside analogues: resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism. / Tsesmetzis, N., Paulin, C. B., Rudd, S. G., Herold, N. //Cancers. – 2018. – T. 10. – №. 7. – C. 240.
 51. Thomson J.M. Nucleoside analogues as antibacterial agents. / Thomson J.M., Lamont I.L. // Frontiers in microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 952.
 52. Shi H. omparing efficacy of lamivudine, adefovir dipivoxil, telbivudine, and entecavir in treating nucleoside analogues naive for HBeAg-negative hepatitis B with medium hepatitis B virus (HBV) DNA levels. / Shi, H., Han, Z., Liu, J., Xue, J., Zhang, S., Zhu, Z., Xia, J., Huang, M. //Medical science monitor: International medical journal of experimental and clinical research. – 2017. – T. 23. – C. 5230.

53. Fitzmaurice C. A systematic analysis for the global burden of disease study. / Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., Brenner, H., Dicker, D. J. //JAMA Oncol. – 2017. – T. 3. – №. 4. – C. 524-548.
54. Sung H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. / Sung H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. // CA. Cancer J. Clin. Wiley Online Library. – 2021. – T. 71. – № 3. – C. 209–249.
55. Lucas L. K. Recent advances in pharmacotherapy for cancer pain management. / Lucas L. K., Lipman A. G. //Cancer practice. – 2002. – T. 10. – C. s14-s20.
56. Emami L. et al. Synthesis, design, biological evaluation, and computational analysis of some novel uracil-azole derivatives as cytotoxic agents,. / Emami, L., Zare, F., Khabnadideh, S., Rezaei, Z., Sabahi, Z., Zare Gheshlaghi, S., Behrouz, M., Emami, M., Ghobadi, Z., Ardekani, S.M. Barzegar, F., Ebrahimi A., Sabet, R. //BMC chemistry. – 2024. – T. 18. – №. 1. – C. 3.
57. Rose M. G. Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. / Rose M. G., Farrell M. P., Schmitz J. C. //Clinical colorectal cancer. – 2002. – T. 1. – №. 4. – C. 220-229.
58. Hoff P. UFT plus oral leucovorin: a new oral treatment for colorectal cancer. / Hoff P. M., Pazdur R. //The Oncologist. – 1998. – T. 3. – №. 3. – C. 155-164.
59. Paschall A.V. H3K9 trimethylation silences Fas expression to confer colon carcinoma immune escape and 5-fluorouracil chemoresistance. / Paschall, A. V., Yang, D., Lu, C., Choi, J. H., Li, X., Liu, F., Figueroa, M., Oberlies, N.H., Pearce, C., Bollag, W.B., Nayak-Kapoor, A., Liu, K. //The Journal of Immunology. – 2015. – T. 195. – №. 4. – C. 1868-1882.
60. Lone M.N. Synthesis and biological evaluation of novel uracil derivatives

- as thymidylate synthase inhibitors. / Lone, M. N., Gul, S., Mehraj, U., Sofi, S., Dar, A. H., Ganie, S. A., Wani, N.A., Mir, M.A., Zargar, M.A. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2023. – T. 195. – №. 10. – C. 6212-6231.
61. Hoff P.M. The Tegafur-Based Dihydropyrimidine Dehydrogenase Inhibitory Fluoropyrimidines, UFT/Leucovorin (ORZEL and S-1: a Review of Their Clinical Development and Therapeutic Potential. / Hoff P.M. // *Investigational new drugs*. – 2000. – T. 18. – №. 4. – C. 331-342.
 62. Libra M. Thymidylate synthetase mRNA levels are increased in liver metastases of colorectal cancer patients resistant to fluoropyrimidine-based chemotherapy. / Libra, M., Navolanic, P. M., Talamini, R., Cecchin, E., Sartor, F., Tumolo, S., Maiser, S., Travali, S., Boiocci, M., Toffoli, G. // *BMC cancer*. – 2004. – T. 4. – №. 1. – C. 11.
 63. Beumer J.H. Pharmacokinetics, metabolism, and oral bioavailability of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine in mice. / Beumer, J.H., Eiseman, J. L., Parise, R. A., Joseph, E., Holleran, J. L., Covey, J. M., Egorin, M.J. // *Clinical cancer research*. – 2006. – T. 12. – №. 24. – C. 7483-7491.
 64. Segura M. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? / Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., Gottschalk, M. // *Trends in microbiology*. – 2017. – T. 25. – №. 7. – C. 585-599.
 65. Vötsch D. *Streptococcus suis*—the “two faces” of a pathobiont in the porcine respiratory tract. / Vötsch, D., Willenborg, M., Weldearegay, Y. B., Valentin-Weigand, P. // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – T. 9. – C. 480.
 66. Uruén C. How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments. / Uruén, C., García, C., Fraile, L., Tommassen, J., Arenas, J. // *Veterinary research*. – 2022. – T. 53. – №. 1. – C. 91.
 67. Li J. Evaluating the antibacterial and antivirulence activities of floxuridine against *Streptococcus suis*. / Li, J., Han, N., Li, Y., Zhao, F., Xiong, W., Zeng, Z. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24. –

- №. 18. – C. 14211.
68. Li J. J. Thyroid receptor agonists for the treatment of androgenetic alopecia. / Li, J.J., Mitchell, L.H., Dow, R.L. //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2010. – T. 20. – №. 1. – C. 306-308.
 69. Babkov D. A. Toward the discovery of dual HCMV–VZV inhibitors: Synthesis, structure activity relationship analysis, and cytotoxicity studies of long chained 2-uracil-3-yl-N-(4-phenoxyphenyl) acetamides. / Babkov, D.A., Khandazhinskaya, A.L., Chizhov, A.O., Andrei, G., Snoeck, R., Seley-Radtke, K. L., Novikov, M.S. //Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2015. – T. 23. – №. 21. – C. 7035-7044.
 70. Wen Z. Antiviral and Cytostatic Evaluation of 5-(1-Halo-2-sulfonylvinyl)- and 5-(2-Furyl) uracil Nucleosides. / Wen, Z., Suzol, S. H., Peng, J., Liang, Y., Snoeck, R., Andrei, G., Liekens, S., Wnuk, S.F. //Archiv der Pharmazie. – 2017. – T. 350. – №. 3-4. – C. 1700023.
 71. Jain K. Uracil: A Pharmacophore with Diverse Biological Potential. / Jain K., Sharma S., Utreja D. //ChemistrySelect. – 2024. – T. 9. – №. 5. – C. e202303179.
 72. Tanaka H. A new class of HIV-1 specific 6-substituted acyclouridine derivatives: synthesis and anti-HIV-1 activity of 5-or 6-substituted analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy) methyl]-6-(phenylthio) thymine (HEPT). / Tanaka, H., Baba, M., Hayakawa, H., Sakamaki, T., Miyasaka, T., Ubasawa, M., Takashima, H., Sekiya, K., Nitta, I., Shigeta, S., Walker, R., Balzarini, J., De Clercq, E. //Journal of medicinal chemistry. – 1991. – T. 34. – №. 1. – C. 349-357.
 73. Novikov M.S. Synthesis and anti-HCMV activity of 1-[ω-(phenoxy) alkyl] uracil derivatives and analogues thereof. / Novikov, M.S., Babkov, D.A., Paramonova, M.P., Khandazhinskaya, A.L., Ozerov, A.A., Chizhov, A.O., Andrei, G., Snoeck, R., Balzarini, J., Seley-Radtke, K.L. //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2013. – T. 21. – №. 14. – C. 4151-4157.
 74. Poorvashree J. Novel drug delivery of dual acting prodrugs of

- hydroxychloroquine with aryl acetic acid NSAIDs: Design, kinetics and pharmacological study. / Poorvashree J., Suneela D. //Drug Delivery and Translational Research. – 2017. – T. 7. – №. 5. – C. 709-730.
75. Khandazhinskaya A. L. Dual-targeted anti-CMV/anti-HIV-1 heterodimers. / Khandazhinskaya, A. L., Mercurio, V., Maslova, A. A., Palomino, R. A. Ñ., Novikov, M. S., Matyugina, E. S., Paramonova, M.P., Kukhanova, M.K., Fedorova, N., Yurlov, K.I., Kushch, A.A., Tarasova, O., Margolis, L., Kochetkova, S.N., Vanpouille, C. //Biochimie. – 2021. – T. 189. – C. 169-180.
 76. Chakraborty G. Nickel catalyzed sustainable synthesis of benzazoles and purines via acceptorless dehydrogenative coupling and borrowing hydrogen approach. / Chakraborty, G., Mondal, R., Guin, A. K., Paul, N. D. //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2021. – T. 19. – №. 33. – C. 7217-7233.
 77. Doganc F. Regioselective N-alkylation of some 2 or 6-chlorinated purine analogues. / Doganc, F., Aydin, A. S., Şahin, E., Göker, H. //Journal of Molecular Structure. – 2023. – T. 1272. – C. 134200.
 78. Valiaeva N. Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of acyclic purine and pyrimidine nucleoside phosphonates against HIV-1 in vitro. / Valiaeva, N., Beadle, J. R., Aldern, K. A., Trahan, J., Hostetler, K. Y. //Antiviral research. – 2006. – T. 72. – №. 1. – C. 10-19.
 79. Ashry E. Synthesis of 2-bromomethyl-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-propyl pyrimidine and theophylline nucleosides under microwave irradiation. Evaluation of their activity against hepatitis B virus. / Ashry, E. E., Rashed, N., Abdel-Rahman, A., Awad, L. F., Rasheed, H. A. //Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. – 2006. – T. 25. – №. 8. – C. 925-939.
 80. Kascatan-Nebioglu A. Synthesis from caffeine of a mixed N-heterocyclic carbene– silver acetate complex active against resistant respiratory pathogens. / Kascatan-Nebioglu, A., Melaiye, A., Hindi, K., Durmus, S., Panzner, M. J., Hogue, L. A., Mallet, R.J., Hovis, C.E., Coughenour, M., Crosby, S.D., Milsted A., Ely, D.L., Tessier, C.A., Cannon, C.L., Youngs,

- W.J. //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – T. 49. – №. 23. – C. 6811-6818.
81. Maddheshiya A.K. Synergistic activity of noble trimetallic nanofluids: unveiling unprecedented antimicrobial potential and computational insights. / Maddheshiya, A. K., Kumar, M., Tufail, A., Yadav, P. S., Deswal, Y., Yadav, N., Dubey, A. //ACS Applied Bio Materials. – 2024. – T. 7. – №. 9. – C. 5906-5924.
 82. Salas-Ambrosio P. Caffeine and cationic copolymers with antimicrobial properties. / Salas-Ambrosio, P., Vexler, S., PS, R., Chen, I. A., Maynard, H. D. //ACS bio & med Chem Au. – 2023. – T. 3. – №. 2. – C. 189-200.
 83. Chaurasiya A. An insight into the rational design of recent purine-based scaffolds in targeting various cancer pathways. / Chaurasiya, A., Wahan, S. K., Sahu, C., Chawla, P. A. //Journal of Molecular Structure. – 2023. – T. 1274. – C. 134308.
 84. Guo Y. Design, synthesis and biological evaluation of purine-based derivatives as novel JAK2/BRD4 (BD2) dual target inhibitors. / Guo, Y., Zou, Y., Chen, Y., Deng, D., Zhang, Z., Liu, K., Tang, M., Yang, T., Fu, S., Zhang, C., Si, W., Ma, Z., Zhang, S., Peng, B., Xu, D., Chen, L. //Bioorganic Chemistry. – 2023. – T. 132. – C. 106386.
 85. Mohamed A.R. Design, synthesis and in silico insights of new 7, 8-disubstituted-1, 3-dimethyl-1H-purine-2, 6 (3H, 7H)-dione derivatives with potent anticancer and multi-kinase inhibitory activities. / Mohamed, A.R., El Kerdawy, A.M., George, R.F., Georgey, H.H., Gawad, N.M.A. //Bioorganic Chemistry. – 2021. – T. 107. – C. 104569.
 86. Schino I. et al. Exploring mannosylpurines as copper chelators and cholinesterase inhibitors with potential for Alzheimer's disease. / Schino, I., Cantore, M., De Candia, M., Altomare, C. D., Maria, C., Barros, J., Cachatra, V., Calado, P., Shimixu, K., Freitas, A.A., Olivera, M.C., Ferreira, M.J., Lopes, J.N.C., Colabufo, N.A., Rauter, A.P. //Pharmaceuticals. – 2022. – T. 16. – №. 1. – C. 54.

87. Baroud M. The evolution of nucleosidic analogues: self-assembly of prodrugs into nanoparticles for cancer drug delivery. / Baroud, M., Lepeltier, E., Thepot, S., El-Makhour, Y., Duval, O. //Nanoscale Advances. – 2021. – T. 3. – №. 8. – C. 2157-2179.
88. Bantia S. Potent orally bioavailable purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-4208 induces apoptosis in B-and T-lymphocytes—A novel treatment approach for autoimmune diseases, organ transplantation and hematologic malignancies. / Bantia, S., Parker, C., Upshaw, R., Cunningham, A., Kotian, P., Kilpatrick, J. M., Morris, P., Chand, P., Babu, Y.S. //International immunopharmacology. – 2010. – T. 10. – №. 7. – C. 784-790.
89. Bennett L. L. et al. Purine nucleoside phosphorylase inhibitors: biochemical and pharmacological studies with 9-benzyl-9-deazaguanine and related compounds. / Bennett, L.L., Allan, P.W., Noker, P.E., Rose, L.M., Niwas, S.H. R.I., Montgomery, J.A., Erion, M.D. //The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1993. – T. 266. – №. 2. – C. 707-714.
90. Evans G.B. Exploring structure– activity relationships of transition state analogues of human purine nucleoside phosphorylase. / Evans, G. B., Furneaux, R. H., Lewandowicz, A., Schramm, V. L., Tyler, P. C //Journal of medicinal chemistry. – 2003. – T. 46. – №. 15. – C. 3412-3423.
91. Polat M. F. Synthesis and cytotoxicity of novel 6, 8, 9-trisubstituted purine analogs against liver cancer cells. / Polat, M. F., Şahin, I. D., Kul, P., Atalay, R. C., Tuncbilek, M. //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2024. – T. 106. – C. 129775.
92. Das D., Xie L., Hong J. Next-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors to overcome C797S mutation in non-small cell lung cancer (2019–2024). / Das D., Xie L., Hong J. //RSC Medicinal Chemistry. – 2024. – T. 15. – №. 10. – C. 3371-3394.
93. Ahmed N.M. Design, synthesis, molecular modeling and antitumor evaluation of novel indolyl-pyrimidine derivatives with EGFR inhibitory

- activity. / Ahmed, N. M., Youns, M. M., Soltan, M. K., Said, A. M. //Molecules. – 2021. – Т. 26. – №. 7. – С. 1838.
94. Hei Y. Y. et al. Synthesis and evaluation of 2, 9-disubstituted 8-phenylthio/phenylsulfinyl-9H-purine as new EGFR inhibitors. / Hei, Y. Y., Shen, Y., Wang, J., Zhang, H., Zhao, H. Y., Xin, M., Cao, Y.-X., Li, Y., Zhang, S. Q. //Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2018. – Т. 26. – №. 8. – С. 2173-2185.
 95. Zhao T. Q. et al. Novel 3-(2, 6, 9-trisubstituted-9H-purine)-8-chalcone derivatives as potent anti-gastric cancer agents: Design, synthesis and structural optimization./ Zhao, T. Q., Zhao, Y. D., Liu, X. Y., Li, Z. H., Wang, B., Zhang, X. H., Cao, Y.-Q., Ma, Li.-Y.,Liu, H. M. //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Т. 161. – С. 493-505.
 96. Mansouri A. E. L. et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of new 1, 3, 4-oxadiazole homonucleosides and their double-headed analogs as antitumor agents./ Mansouri, A.E.E., Oubella, A., Mehdi, A., AitItto, M. Y., Zahouily, M., Morjani, H., Lazrek, H.B. //Bioorganic Chemistry. – 2021. – Т. 108. – С. 104558.
 97. Киселев А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. Высш. шк., 1986.
 98. Иванова Ю.П., Иванов М.Ю., Буряк А.К. Математические модели динамических процессов адсорбции и тепломассопереноса в многокомпонентных смесях. Издательство МГТУ им. НЭ Баумана, 2024. 100 с.
 99. Soukup J. Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography./ Soukup J., Jandera P. // J. Chromatogr. a. Elsevier, 2014. Т. 1374. С. 102–111.
 100. Lough W.J., Wainer I.W. High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. cRc press, 1995.
 101. Лисичкин Г.В., Фадеев, А.Ю., Сердан, А.А., Нестеренко, П.Н., Мингалев, П.Г. ДБ Фурман. Химия привитых поверхностных

- соединений/Под ред. ГВ Лисичкина.—М.: Физматлит, 2003. с //Вопросы и задания к главе. — 2003. — Т. 1. — С. 24.
102. Слиякова И.Б., Денисова Т.И. Кремнийорганические адсорбенты: Получение, свойства, применение. — Наукова думка, 1988.
 103. Холин Ю.В. Количественный физико-химический анализ комплексообразования в растворах и на поверхности химически модифицированных кремнеземов: содержательные модели, математические методы и их приложения. Харьков: Фолио, 2000.
 104. Tsyurupa M.P. Physicochemical and adsorption properties of hypercross-linked polystyrene with ultimate cross-linking density./ Tsyurupa, M. P., Blinnikova, Z. K., Borisov, Y. A., Ilyin, M. M., Klimova, T. P., Mitsen, K. V., Davankov, V. A. //Journal of separation science. — 2014. — Т. 37. — №. 7. — С. 803-810.
 105. Hanai T. Separation of polar compounds using carbon columns //Journal of Chromatography A. — 2003. — Т. 989. — №. 2. — С. 183-196.
 106. Knox J.H. Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography./ Knox J. H., Kaur B., Millward G.R. //Journal of Chromatography A. — 1986. — Т. 352. — С. 3-25.
 107. Forgács E. Retention characteristics and practical applications of carbon sorbents //Journal of Chromatography A. — 2002. — Т. 975. — №. 2. — С. 229-243.
 108. Smyth W. F. Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis //Electrophoresis. — 2005. — Т. 26. — №. 7-8. — С. 1334-1357.
 109. Sharma M. An epigrammatic status of the ‘azole’-based antimalarial drugs./ Sharma M., Prasher P. //RSC Medicinal Chemistry. — 2020. — Т. 11. — №. 2. — С. 184-211.
 110. Özdemir M. A novel one-pot synthesis of heterocyclic compound (4-benzoyl-5-phenyl-2-(pyridin-2-yl)-3, 3a-dihydropyrazolo [1, 5-c] pyrimidin-7 (6H)-one): Structural (X-ray and DFT) and spectroscopic (FT-IR, NMR, UV-Vis and Mass) characterization Studies. / Özdemir, M.,

- Sönmez, M., Şen, F., Dinçer, M., Özdemir, N. //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – T. 137. – C. 1304-1314.
111. Musil Z. Synthesis, Separation and UV/Vis Spectroscopy of Pyrazino-quinoxalino-porphyrazine Macrocycles. / Musil, Z., Zimcik, P., Miletin, M., Kopecky, K., Lenco, J./ – 2007.
 112. Keil D. Preparation and UV/Vis Spectroscopic Characterization of N, N-Disubstituted 2-Amino-5-arylazoselenazoles and Some of Their Carbocyclic and Heterocyclic Analogues./ Keil, D., Hartmann, H., Zug, I., Schroeder, A. //Journal für praktische Chemie. – 2000. – T. 342. – №. 2. – C. 169-174.
 113. Dürüst Y. Synthesis, UV–Vis spectra, and Hammett correlation of some novel bis (dihydropyrrolo [3, 4-c] pyrazoles)./ Dürüst Y., Yıldırım M. //Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly. – 2010. – T. 141. – №. 9. – C. 961-973.
 114. Mathew V. Heterocyclic System Containing Bridgehead Nitrogen Atom: Synthesis and Pharmacological Activities of Some Substituted 1, 2, 4-Triazolo [3, 4-b]-1, 3, 4-thiadiazoles./ Mathew V., Keshavayya J., Vaidya V. P. //ChemInform. – 2007. – T. 38. – №. 5. – C. no-no.
 115. Dwivedi A.R. A decade of pyridine-containing heterocycles in US FDA approved drugs: a medicinal chemistry-based analysis./ Dwivedi, A. R., Jaiswal, S., Kukkar, D., Kumar, R., Singh, T. G., Singh, M. P., Gaidhane, A.M., Lakhanpal, S., Prasad, K. N.,Kumar, B. //RSC Medicinal Chemistry. – 2025. – T. 16. – №. 1. – C. 12-36.
 116. Shin J. H. Quantitative analysis of heterocyclic amines in urine by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry./ Shin, J. H., Na, Y. C., Chung, J. H., Gorinstein, S., Ahn, Y. G. //Analytical Biochemistry. – 2014. – T. 447. – C. 169-176.
 117. Keim H. Method for determining nitrogenous heterocycle compounds in wine./ Keim, H., de Revel, G., Marchand, S., Bertrand, A. //Journal of

- agricultural and food chemistry. – 2002. – T. 50. – №. 21. – C. 5803-5807.
118. Rohloff J. Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling //Molecules. – 2015. – T. 20. – №. 2. – C. 3431-3462.
 119. Szappanos Á. et al. Synthesis and HPLC-ECD Study of Cytostatic Condensed O, N-Heterocycles Obtained from 3-Aminoflavanones./ Szappanos, Á., Mándi, A., Gulácsi, K., Lisztes, E., Tóth, B. I., Bíró, T., Konya-Abraham, A., Szikszai, A.K., Benyei, A., Antus, S., Kurtán, T. //Biomolecules. – 2020. – T. 10. – №. 10. – C. 1462.
 120. Abdighahroudi M. S. Development of an LC-MS method for determination of nitrogen-containing heterocycles using mixed-mode liquid chromatography: Abdighahroudi MS et al. / Abdighahroudi M. S., Lutze H. V., Schmidt T. C. //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2020. – T. 412. – №. 20. – C. 4921-4930.
 121. Sentellas S. Determination of heterocyclic aromatic amines by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry using in-line preconcentration./ Sentellas, S., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M. T. //Electrophoresis. – 2003. – T. 24. – №. 17. – C. 3075-3082.
 122. Huck C. W. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for forensic analysis./ Huck, C. W., Huck-Pezzei, V., Bakry, R., Bachmann, S., Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Bonn, G. K. //The Open Chemical Engineering Journal. – 2007. – T. 1. – №. 1.
 123. Rosales-Conrado N. Determination of heterocyclic aromatic amines by capillary high-performance liquid chromatography with diode array detection in ready-to-eat cooked ham treated with electron-beam irradiation./ Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Pérez-Arribas, L. V., Polo-Díez, L. M. //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2008. – T. 391. – №. 4. – C. 1433-1442.
 124. Švábenský R. The study of properties of HPLC determination of polycyclic aromatic nitrogen heterocycles./ Švábenský R., Kočí K., Šimek Z.

- //International Journal of Environmental and Analytical Chemistry. – 2007. – T. 87. – №. 5. – C. 337-349.
125. Wu S. Development and validation of a multianalyte method for quantification of isoxazolines in animal-derived matrix samples using SPE-HPLC–MS/MS./ Wu, S., Wang, Y., Li, X., Zhou, T., Niu, Y., Zhou, H., Niu, Y., Zhou, H., Zheng, W., Huang, X., Hu, J., Wang, J., Yin, W. //Journal of Food Composition and Analysis. – 2023. – T. 123. – C. 105620.
 126. Yarovaya O. I. Synthesis of N-heterocyclic amides based on (+)-camphoric acid and study of their antiviral activity and pharmacokinetics./ Yarovaya, O. I., Baranova, D. V., Sokolova, A. S., Nemolochnova, A. G., Sal'nikova, O. P., Fat'anova, A. V., Rogachev, A.D., Volobueva, A.S., Zarubaev, V.V., Pokrovsky, A.G., Salakhutdinov, N. F //Russian Chemical Bulletin. – 2023. – T. 72. – №. 3. – C. 807-818.
 127. Szultka-Mlynska M. Electrochemical oxidation of selected immunosuppressants and identification of their oxidation products by means of liquid chromatography and tandem mass spectrometry (EC-HPLC-MS/MS)/ Szultka-Mlynska M., Buszewski B. //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2019. – T. 176. – C. 112799.
 128. Qiu J. Nontargeted Identification of an N-Heterocyclic Compound in Source Water and Wastewater as a Precursor of Multiple Nitrosamines./ Qiu, J., Zhang, Y., Craven, C., Liu, Z., Gao, Y., & Li, X. F. //Environmental science & technology. – 2021. – T. 55. – №. 1. – C. 385-392.
 129. Jian S. H. Analysis of heterocyclic amines in meat products by liquid chromatography–Tandem mass spectrometry./ Jian, S. H., Yeh, P. J., Wang, C. H., Chen, H. C., Chen, S. F. //journal of food and drug analysis. – 2019. – T. 27. – №. 2. – C. 595-602.
 130. He J. An HPLC–MS/MS method for the quantitative determination of 4-hydroxy-anethole trithione in human plasma and its application to a pharmacokinetic study./ He, J., Qin, T., Wen, J., Qin, F., Li, F. //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2011. – T. 54. – №. 3. – C. 551-

556.

131. Üstün Z. Determination of the dissociation constants of six pharmacologically active imidazole antifungal agents by RPLC method./ Üstün Z., Demiralay E. Ç. //Microchemical Journal. – 2025. – C. 116019.
132. Jenkins N. Simultaneous determination of voriconazole, posaconazole, itraconazole and hydroxy-itraconazole in human plasma using LCMS/MS./ Jenkins N., Black M., Schneider H. G. //Clinical Biochemistry. – 2018. – T. 53. – C. 110-115..
133. Wang Y. Simultaneous determination of a four-triazole antifungal panel in human plasma by LC-MS/MS for clinical therapeutic drug monitoring./ Wang, Y., Zhang, G., Zhang, N., Dong, L., Liang, B., Cai, Y. //Microchemical Journal. – 2026. – C. 117877.
134. Černá K. Chromatographic method for rapid determination of triazoles in ribavirin intermediates synthesis: stationary phase comparison./ Černá K., Kozlík P. //Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly. – 2024. – T. 155. – №. 8. – C. 805-811.
135. Grinevich O. I. Retention Behavior of Nitrogen-Containing Heterocyclic Compounds in Reversed-Phase and Hydrophilic HPLC–MS./ Grinevich O. I., Sholokhova A. Y., Matyushin D. D. //Journal of Analytical Chemistry. – 2025. – T. 80. – №. 5. – C. 903-911.
136. Liebler D. Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry./ Liebler D. C., Zimmerman L. J. //Biochemistry. – 2013. – T. 52. – №. 22. – C. 3797-3806.
137. Jain S. K. An Optimized Method for LC–MS-Based Quantification of Endogenous Organic Acids: Metabolic Perturbations in Pancreatic Cancer./ Jain, S. K., Bansal, S., Bansal, S., Singh, B., Klotzbier, W., Mehta, K. Y., Cheema, A. K. //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – №. 11. – C. 5901.
138. da Silva J. M. Speciation of nitrogen-containing compounds in an unfractionated coal tar sample by comprehensive two-dimensional gas

- chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry./ da Silva, J. M., Machado, M. E., Maciel, G. P., Dal Molin, D., Caramão, E. B. //Journal of Chromatography A. – 2014. – T. 1373. – C. 159-168.
139. Kluska M. Occurrence, Properties, Applications and Analytics of Cytosine and Its Derivatives./Kluska, M., Jabłońska, J., Prukala, D., Prukala, W. //Molecules. – 2025. – T. 30. – №. 17. – C. 3598.
 140. Olsen B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities //Journal of chromatography A. – 2001. – T. 913. – №. 1-2. – C. 113-122.
 141. Liu H. Comparison of three derivatization reagents for the simultaneous determination of highly hydrophilic pyrimidine antitumor agents in human plasma by LC–MS/MS./ Liu, H. Y., Ding, L., Yu, Y., Chu, Y., Zhu, H. //Journal of Chromatography B. – 2012. – T. 893. – C. 49-56.
 142. Pandey K. A critical review on clinical application of separation techniques for selective recognition of uracil and 5-fluorouracil./ Pandey K., Dubey R. S., Prasad B. B. //Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2016. – T. 31. – №. 1. – C. 3-12.
 143. Pereira L. Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications./ Pereira L. //Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®. – 2008. – T. 31. – №. 11-12. – C. 1687-1731.
 144. Hahn R. Z. Improved determination of uracil and dihydrouracil in plasma after a loading oral dose of uracil using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and porous graphitic carbon stationary phase. / Galarza, A. F. A., Schneider, A., Antunes, M. V., Schwartzmann, G., & Linden, R. //Clinical Biochemistry. – 2015. – T. 48. – №. 13-14. – C. 915-918.
 145. Bennani Y. An optimized HPLC-MS/MS assay for uracil and dihydrouracil in plasma: Improving dihydropyrimidine dehydrogenase phenotyping for individualized fluoropyrimidine treatment. / Chehade C., Samer C., Kössler T., Thomas A., Daali Y. //Journal of Chromatography B. – 2026. – C. 124926.
 146. Büchel B. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5, 6-

- dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5, 6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. / Rhyn P., Schürch S., Bühr C., Amstutz U., R. Largiadèr C. //Biomedical Chromatography. – 2013. – T. 27. – №. 1. – C. 7-16.
147. van den Wildenberg S. A. H. Quantification of uracil, dihydrouracil, thymine and dihydrothymine for reliable dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) phenotyping critically depend on blood and plasma storage conditions. / Streng A. S., van den Broek R., Broeren M. A., Deenen M. J., van Dongen J. L., Hanrath M. A., Lapre C., Brunsveld L., Scharnhorst V., van de Kerkhof D. //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2022. – T. 221. – C. 115027.
 148. Gupta V. P. Principles and applications of quantum chemistry. – Academic Press, 2015.
 149. McQuarrie D. A. Quantum Chemistry University Science Books //Mill Valley CA. – 1983.
 150. Born M. On the quantum theory of molecules. / Oppenheimer R. //Quantum Chemistry: Classic Scientific Papers. – 2000. – C. 1-24.
 151. Boys S. F. Electronic wave functions. I. A general method of calculation for the stationary states of any molecular system //Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences. – 1950. – C. 542-554.
 152. Panigrahi D. Pharmacophore modelling, QSAR study, molecular docking and insilico ADME prediction of 1, 2, 3-triazole and pyrazolopyridones as DprE1 inhibitor antitubercular agents. / Mishra A., Sahu S. K. //SN Applied Sciences. – 2020. – T. 2. – №. 5. – C. 922.
 153. Ghasedi N. DFT based QSAR study on quinolone-triazole derivatives as antibacterial agents. / Ahmadi, S., Ketabi, S., & Almasirad, A. //Journal of Receptors and Signal Transduction. – 2022. – T. 42. – №. 4. – C. 418-428.
 154. Hansch C. p- σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. / Fujita T. //Journal of the American Chemical Society. – 1964. – T. 86. – №. 8. – C. 1616-1626.
 155. Archdeacon D. Topological graph theory //A survey. Congressus Numerantium. – 1996. – T. 115. – №. 5-54. – C. 18.
 156. Aher R. B. 2D-QSAR modeling and two-fold classification of 1, 2, 4-triazole

- derivatives for antitubercular potency against the dormant stage of *Mycobacterium tuberculosis*. / Sarkar D. // *Molecular Diversity*. – 2022. – T. 26. – №. 2. – C. 1227-1242.
157. Kwiatkowski J. S. Tautomerism and electronic structure of biological pyrimidines. / Pullman B. // *Advances in Heterocyclic Chemistry*. – Academic Press, 1975. – T. 18. – C. 199-335.
 158. Jha K. T. Stereoisomerism in chemistry and drug development: optical, geometrical, and conformational isomers. – 2025.
 159. Yurenko Y. P. Comprehensive conformational analysis of the nucleoside analogue 2'- β -deoxy-6-azacytidine by DFT and MP2 calculations. / Zhurakivsky R. O., Ghomi M., Samijlenko S. P., Hovorun D. M. // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2007. – T. 111. – №. 22. – C. 6263-6271.
 160. Emel'yanova N. S. Regularities of the sorption of cycloalkenyl-substituted thiophenes and 2, 2'-bithiophenes from water-acetonitrile solutions on hexadecyl silica gel under conditions of high-performance liquid chromatography. / Kurbatova S. V., Saifutdinov B. R., Yudashkin A. V. // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2011. – T. 85. – №. 8. – C. 1440-1449.
 161. Nekrasova N. A. Regularities of the sorption of 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline derivatives under conditions of reversed phase HPLC. / Kurbatova S. V., Zemtsova M. N. // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2016. – T. 90. – №. 12. – C. 2471-2476.
 162. Polyakova Y. QSPR models for chromatographic retention of some azoles with physicochemical properties. / Jin L. M., Row K. H. // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2006. – T. 27. – №. 2. – C. 211-218.
 163. Zhang S. G. QSAR study on N-containing corrosion inhibitors: Quantum chemical approach assisted by topological index. / Lei W., Xia M. Z., Wang F. Y. // *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. – 2005. – T. 732. – №. 1-3. – C. 173-182.
 164. Awad M. K. Computational simulation of the molecular structure of some triazoles as inhibitors for the corrosion of metal surface. / Mustafa M. R., Elnga M. M. A. // *Journal of molecular structure: theochem*. – 2010. – T. 959. – №. 1-3. – C. 66-74.

165. Cojocaru C. Molecular structure and modeling studies of azobenzene derivatives containing maleimide groups. / Airinei A., Fifere N. //SpringerPlus. – 2013. – T. 2. – №. 1. – C. 586.
166. Bannwarth C. Extended tight-binding quantum chemistry methods. / Caldeweyher E., Ehlert S., Hansen A., Pracht P., Seibert J., Specher S, Grimme, S. //Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2021. – T. 11. – №. 2. – C. e1493.
167. Spicher S. Robust atomistic modeling of materials, organometallic, and biochemical systems. / Grimme S. //Angewandte Chemie. – 2020. – T. 132. – №. 36. – C. 15795-15803.
168. Katbashev A. Overview on building blocks and applications of efficient and robust extended tight binding. / Stahn M., Rose T., Alizadeh V., Fried M., Plett C., Steinbach P., Ehlert, S. //The Journal of Physical Chemistry A. – 2025. – T. 129. – №. 10. – C. 2667-2682.
169. Bannwarth C. GFN2-xTB—An accurate and broadly parametrized self-consistent tight-binding quantum chemical method with multipole electrostatics and density-dependent dispersion contributions. / Ehlert S., Grimme S. //Journal of chemical theory and computation. – 2019. – T. 15. – №. 3. – C. 1652-1671.
170. Jin R. Y. Design, synthesis, biological activities and DFT calculation of novel 1, 2, 4-triazole Schiff base derivatives. / Zeng C. Y., Liang X. H., Sun X. H., Liu Y. F., Wang Y. Y., Zhou S. //Bioorganic chemistry. – 2018. – T. 80. – C. 253-260.
171. Karunakaran V., FT-IR, FT-Raman spectra, NBO, HOMO–LUMO and thermodynamic functions of 4-chloro-3-nitrobenzaldehyde based on ab initio HF and DFT calculations. / Balachandran V. //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2012. – T. 98. – C. 229-239.
172. Jin R. Y. Synthesis, crystal structure, biological activity and theoretical calculations of novel isoxazole derivatives. / Sun X. H., Liu Y. F., Long W., Chen B., Shen S. Q., Ma H. X. //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2016. – T. 152. – C. 226-232.
173. Kumar C. B. P. Fluorine substituted thiomethyl pyrimidine derivatives as efficient inhibitors for mild steel corrosion in hydrochloric acid solution: Thermodynamic, electrochemical and DFT studies. / Mohana K. N., Raghu M. S., Jagadeesha M.

- B., Prashanth M. K., Lokanath N. K. //Journal of Molecular Liquids. – 2020. – T. 311. – C. 113311
174. Johansson A. Metabolomics and wood development //Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. – 2013. – №. 2013: 92.
 175. Jandera P. Comparison of various modes and phase systems for analytical HPLC //Handbook of analytical separations. – Elsevier Science BV, 2000. – T. 1. – C. 1-71.
 176. Goodarzi M. QSRR modeling for diverse drugs using different feature selection methods coupled with linear and nonlinear regressions. / Jensen R., Vander Heyden Y. //Journal of Chromatography B. – 2012. – T. 910. – C. 84-94.
 177. Kezin V. A. New derivatives of 5-substituted uracils: potential agents with a wide spectrum of biological activity. / Matyugina E. S., Novikov M. S., Chizhov A. O., Snoeck R., Andrei G., Kochetkov S., Khandazhinskaya, A. L. //Molecules. – 2022. – T. 27. – №. 9. – C. 2866.
 178. Khandazhinskaya A. Novel fleximer pyrazole-containing adenosine analogues: Chemical, enzymatic and highly efficient biotechnological synthesis. / Eletskaia B., Fateev I., Kharitonova M., Konstantinova I., Barai V., Azhaev A., Hyvonen M.T., Keinanen T.A., Kochetkov S., Seley-Radtke K., Khomutov A., Matyugina E. //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2021. – T. 19. – №. 34. – C. 7379-7389.
 179. Khandazhinskaya A. Design and synthesis of new modified flexible purine bases as potential inhibitors of Human PNP. / Fateev I., Eletskaia B., Maslova A., Konstantinova I., Seley-Radtke K., Kochetkov S., Matyugina E. //Molecules. – 2023. – T. 28. – №. 3. – C. 928.
 180. Hehre W. J. A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations. – Irvine, CA : Wavefunction, 2003. – T. 2.
 181. Ugbe F. A. Molecular docking-based virtual screening, molecular dynamic simulation, and 3-D QSAR modeling of some pyrazolopyrimidine analogs as potent anti-filarial agents. / Shallangwa G. A. Uzairu, A., Abdulkadir I. //In Silico Pharmacology. – 2022. – T. 10. – №. 1. – C. 21.
 182. Fokoue H. H. Fragmentation pattern of amides by EI and HRESI: study of protonation sites using DFT-3LYP data. / Marques J. V., Correia M. V.,

- Yamaguchi L. F., Qu X., Aires-de-Sousa J., Scotti M.T., Lopes N.P., Kato M.J.//RSC advances. – 2018. – Т. 8. – №. 38. – С. 21407-21413.
183. Moriwaki H. Mordred: a molecular descriptor calculator. / Tian Y. S., Kawashita N., Takagi T.//Journal of cheminformatics. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 4.
 184. Pracht P. CREST—A program for the exploration of low-energy molecular chemical space. / Grimme S., Bannwarth C., Bohle F., Ehlert S., Feldmann G., Gorjes J., Muller M., Neudecker T., Plett C., Spicher S., Steinbach P., Wesolowski P.A. Zeller F. //The Journal of Chemical Physics. – 2024. – Т. 160. – №. 11.
 185. Pracht P. Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods. / Bohle F., Grimme S. //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2020. – Т. 22. – №. 14. – С. 7169-7192.
 186. Gritti F. Measurement of hold-up volumes in reverse-phase liquid chromatography: Definition and comparison between static and dynamic methods. / Kazakevich Y., Guiochon G. // J. Chromatogr. A. Elsevier, 2007. Т. 1161, № 1–2. С. 157–169.
 187. Kaliszan R. Mechanism of retention in high-performance liquid chromatography on porous graphitic carbon as revealed by principal component analysis of structural descriptors of solutes. / Ośmiałowski K., Bassler B. J., Hartwick R. A. //Journal of Chromatography A. – 1990. – Т. 499. – С. 333-344.
 188. Авгуль Н.Н., Киселев А.В., Пошкус Д.П. Адсорбция газов и паров на однородных поверхностях. Химия, 1975.
 189. Буряк А. К. Моделирование адсорбции нежестких органических молекул на графитированной термической саже методом Монте-Карло для предсказания их характеристик удерживания. / Матюшин Д. Д. //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17. – №. 2. – С. 204-211.
 190. Polunin K. E. Interaction of S, N-derivatives of alkylhydrazines with carbon sorbents. / Matyushin D. D., Ul'yanov A. V., Polunina I. A., Buryak A. K. //Colloid Journal. – 2019. – Т. 81. – №. 4. – С. 431-438.
 191. Matyushin D. D. Comparative Study of Adsorption of Isomeric Molecules on Carbon Sorbents from a Gas and a Liquid. / Ukleina A. N., Buryak A. K. //Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. – 2020. – Т. 56. – №.

1. – С. 38-43.
192. Matyushin D. D. Simulation of the Adsorption of Polychlorinated Aromatic Hydrocarbons on Graphitized Thermal Carbon Black for Predicting Chromatographic Retention Values. / Buryak A. K. //Journal of Analytical Chemistry. – 2019. – Т. 74. – №. Suppl 1. – С. 47-51.
193. Wang J. Development and testing of a general amber force field. / Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A.//Journal of computational chemistry. – 2004. – Т. 25. – №. 9. – С. 1157-1174.
194. Белякова Л. Д. Хроматография-метод исследования химии поверхности и процессов на межфазных границах. / Буряк А. К., Ларионов О. Г. //Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2013. – Т. 49. – №. 6. – С. 551-551.
195. Estrada E. Generalization of topological indices. //Chemical physics letters. – 2001. – Т. 336. – №. 3-4. – С. 248-252.
196. Ertl P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. / Rohde B., Selzer P. //Journal of medicinal chemistry. – 2000. – Т. 43. – №. 20. – С. 3714-3717.
197. Cordero J. A. Predicting formation of haloacetic acids by chlorination of organic compounds using machine-learning-assisted quantitative structure-activity relationships. / He K., Janya K., Echigo S., Itoh S. //Journal of hazardous materials. – 2021. – Т. 408. – С. 124466.
198. da Silva W. Novel indole-based marinoquinolines as promising candidates against *Toxoplasma gondii*. / Torres T., de Menezes R. P. B., Scotti M. T., Reimão J. Q., Correia C. R. D. //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2025. – С. 118057.
199. Иванова Ю. П. Экспериментальное и теоретическое определение сорбционных характеристик производных 1, 2, 4-триазола методом жидкостной хроматографии и молекулярно-статистическим моделированием. / Буряк А. К. //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2024. – Т. 24. – №. 5. – С. 620-630.
200. Milyushkin A. L. A peculiar chromatographic selectivity of porous graphitic carbon during the separation of dileucine isomers. / Matyushin D. D., Buryak A.

- K. //Journal of Chromatography A. – 2020. – T. 1613. – C. 460724.
201. Aiken L.S., West S.G., Pitts S.C. Multiple linear regression. // Handb. Psychol. Wiley Online Library, 2003. C. 481–507.
202. Brand C. How and why do transition dipole moment orientations depend on conformer structure? / Meerts W. L., Schmitt M. //The Journal of Physical Chemistry A. – 2011. – T. 115. – №. 34. – C. 9612-9619.
203. De Filippis B. Anticancer activity of stilbene-based derivatives. / Ammazalorso A., Fantacuzzi M., Giampietro L., Maccallini C., Amoroso R. //ChemMedChem. – 2017. – T. 12. – №. 8. – C. 558-570.
204. Verma C. Adsorption behavior of glucosamine-based, pyrimidine-fused heterocycles as green corrosion inhibitors for mild steel: experimental and theoretical studies. / Olasunkanmi L.O., Ebenso E.E., Quraishi M. A., Obot I. B. //The Journal of Physical Chemistry C. – 2016. – T. 120. – №. 21. – C. 11598-11611.
205. Haque J. Pyrimidine derivatives as novel acidizing corrosion inhibitors for N80 steel useful for petroleum industry: a combined experimental and theoretical approach. / Ansari K. R., Srivastava V., Quraishi M. A., Obot I. B. //Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2017. – T. 49. – C. 176-188.
206. Khaled M.A. Novel pyrimidine-bichalcophene derivatives as corrosion inhibitors for copper in 1 M nitric acid solution. / Ismail M. A., El-Hossiany A. A., Fouda A.E.A.S. //RSC advances. – 2021. – T. 11. – №. 41. – C. 25314-25333.