

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	4
Введение.....	5
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	22
1.1.3 Применение аналогов пуриновых нуклеозидов в медицине	26
1.2 Физико-химические методы анализа лекарственных препаратов	28
1.2.1 Типы сорбентов, обеспечивающие оптимальную селективность разделения смесей гетероциклов методом обращённо-фазовой ВЭЖХ	32
1.2.2 Применение ВЭЖХ-МС/МС в анализе производных 1,2,4-триазола	41
1.2.3 Анализ производных урацила методом ВЭЖХ-МС/МС	43
1.3 Квантово-химические методы для описания влияния структуры соединений на физико-химические и биологические свойства	45
1.3.1 Общая характеристика квантово-химических методов	45
Выводы по Главе 1	51
Глава 2. Экспериментальная часть	52
2.1 Объекты исследования	52
2.1.1 Производные 1,2,4-триазола	52
2.1.2 Производные урацила	54
2.1.3 Флексимерные производные азотсодержащих гетероциклов	56
2.1.4 Дополнительные реактивы для хроматографического анализа ..	58
2.1.5 Растворители	58
2.2 Оборудование	59
2.2.1 Жидкостная хроматография	59
2.2.2 Масс-спектрометрия в режиме электрораспыления	60
2.2.3 Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией	61
2.2.4 Квантово-химическое моделирование структур азотсодержащих гетероциклов	62
2.2.5 Расчёт термодинамических характеристик сорбции производных 1,2,4-триазола	64

2.2.6 Молекулярно-статистический расчёт констант Генри адсорбции производных 1,2,4-триазола.....	66
Глава 3. Обсуждение результатов	69
3.1 Квантово-химическое и молекулярно-статистическое моделирование для описания структуры азотсодержащих гетероциклических соединений	69
3.1.1 Расчёт физико-химических параметров молекул азотсодержащих гетероциклов.....	69
3.1.2 Вычисление топологических параметров производных пиридина и пиримидина.....	73
3.1.3 Расчёт термодинамических характеристик производных 1,2,4-триазола молекулярно-статистическим методом	74
3.1.4 Вычисление энергетических характеристик молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина.....	78
3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография азотсодержащих гетероциклических соединений.....	81
3.2.1 Адсорбция производных 1,2,4-триазола в условиях обращённо-фазовой жидкостной хроматографии.....	81
3.2.2 Адсорбция производных урацила в условиях обращённо-фазовой жидкостной хроматографии.....	86
3.2.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография флексимерных производных пиридина и пиримидина	88
3.2.4 Построение корреляционных зависимостей между хроматографическими и расчетными физико-химическими параметрами молекул урацила	92
Выводы по разделу 3.2.....	97
3.3 Масс-спектрометрия исследуемых гетероциклических соединений	98
3.3.1 Выбор метода обнаружения и идентификации азотсодержащих гетероциклов.....	98
3.3.2 Фрагментация флексимерных производных пиридина и пиримидина в условиях tandemной масс-спектрометрии.....	99
3.3.3 Tandemная масс-спектрометрия и поиск характеристических ионов производных урацила	106
Выводы по разделу 3.3.....	106
Заключение	107
Список литературы	110

Список сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

HILIC – гидрофильная хроматография (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-танDEMная масс спектрометрия

ОДС – октадецилсиликагель

ПГУ – пористый графитированный углерод

ГТС – графитированная термическая сажа

ЦПС - цианопропилсиликагель

MRM – мониторинг множественных реакций

ПИТ – полный ионный ток

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

DFT – теория функционала плотности (Density 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)

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, грибков 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. Выявить общие закономерности фрагментации молекул производных пиридина и пиримидина при ионизации электрораспылением для поиска набора характеристических ионов, позволяющих ускорить процесс идентификации 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 тандемной 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 5 публикаций 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. Ivanova, Y. P. Characterization of biologically active nitrogen-containing heterocyclic compounds by high-resolution HPLC-MS/MS methods / **Y. P. Ivanova**, I. S. Pytskii, A. K. Buryak, A. L. Khandazhinskaya, E. S. Matyugina // Pure and Applied Chemistry. Q3 (Scopus) (в печати)

3. 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)
4. 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)
5. Нуйкин, С. А. Термодинамическое описание удерживания производных урацила на пористом графитированном углероде в условиях ВЭЖХ / С. А. Нуйкин, **Ю. П. Иванова**, С. Н. Ланин, А. К. Буряк // Сорбционные и хроматографические процессы. (в печати) – 2026. – Т..... – №..... – С. Q4 (Scopus)
6. Boronin, E. N. Photoorganocatalytic E→ Z isomerization of stilbenes in continuous-flow. Organic Chemistry Frontiers // Boronin, E. N., Vorobyov, I. I., Ushakova, A. A., Romanov, K. A., Bolshakov, A. S., Ivanova, Y. P., Freidzon A.Ya., Otvagin V. F., Fedorov A.Yu., Hessel V., Noël T., Nyuchev, A. V. Organic Chemistry Frontiers. – 2026.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на ... страниц, содержит ... таблиц, ... рисунков, состоит из введения, 3 глав, списка используемой литературы, включающего ... источников, и приложения.

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, поддержку и помощь при подготовке диссертационной работы научному руководителю чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. А.К. Буряку, а также всем коллегам, принимавшим участие в исследовании, за доброжелательное отношение и поддержку.

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.

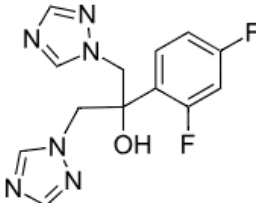
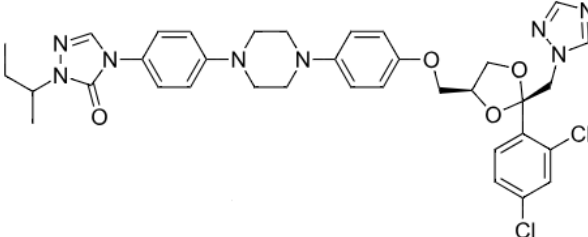
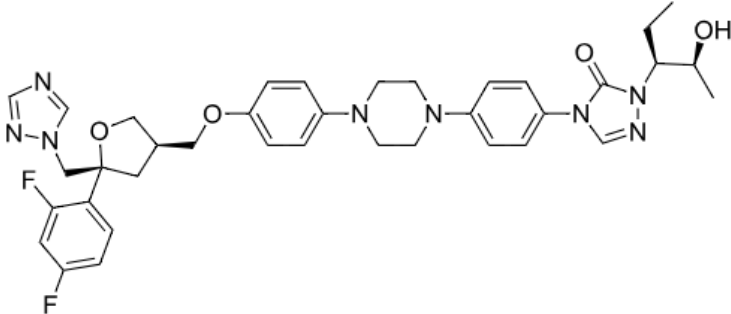
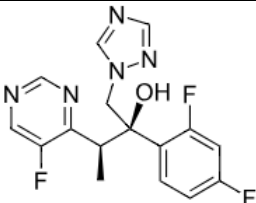
Триазольный гетероцикл является 6π -ароматической электронной системой, проявляющей основные свойства. В структуре кольца присутствуют два типа атомов азота: один содержит свободную электронную пару на p -орбитали, второй – в плоскости кольца [17]. Такое асимметричное распределение электронов приводит к делокализации π -электронной системы, что определяет реакционную способность производных триазола, а также их биологическую активность. Триазольный 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 P450 (CYP), например, 14-альфа-деметилазы (CYP51), 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
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].

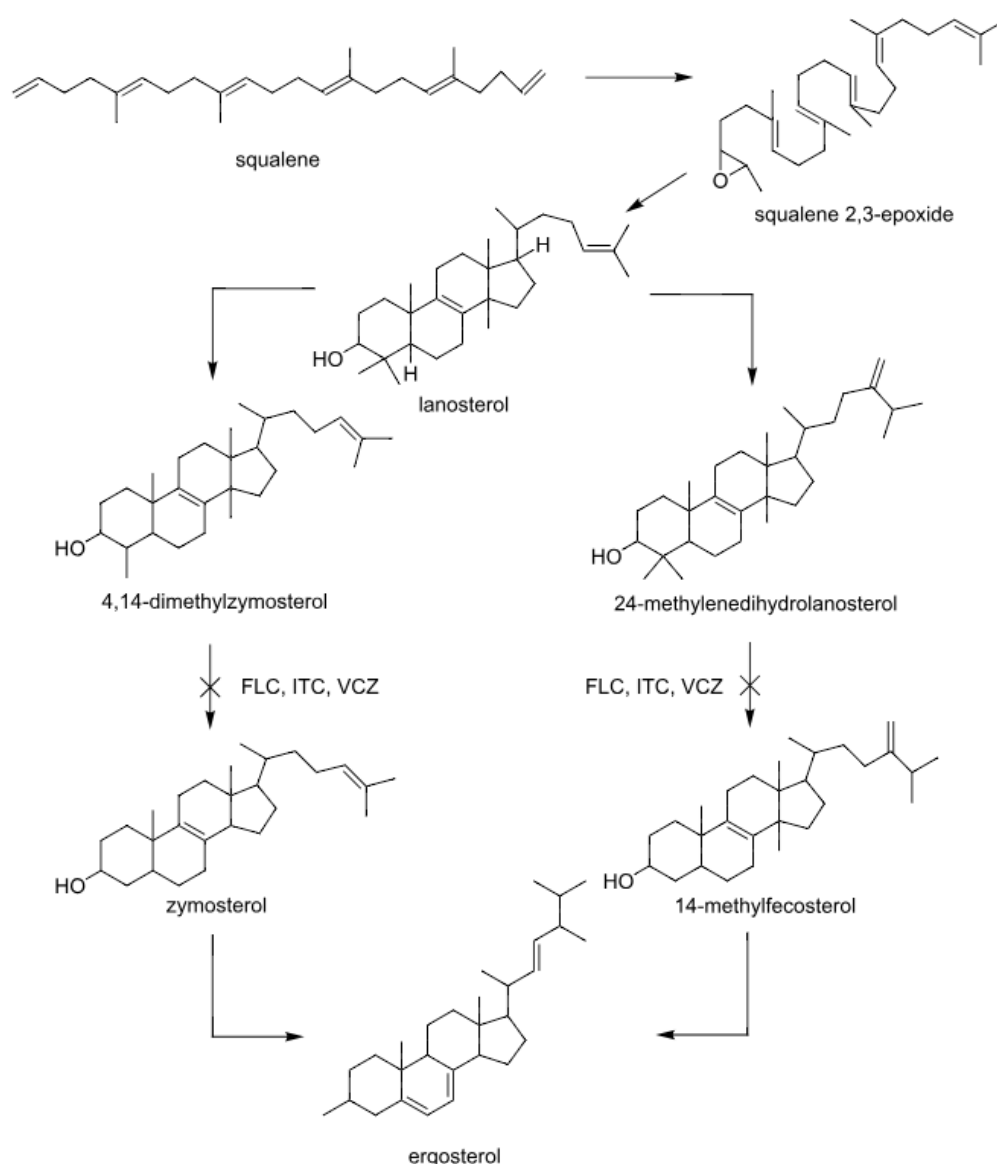


Рисунок 1.1 – Стадии биосинтеза эргостерола, на которых происходит ингибирование производными 1,2,4-триазола: флуконазолом (FLC), итраконазолом (ITC), вориконазолом (VCZ).

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. Данные свойства соединения позволяют лечить тяжёлые гнойные поражения нервной системы, вызванные, например, грибками рода *Candida spp.* или *Aspergillus spp.* Более выраженный терапевтический эффект в отношении последнего рода грибов проявляет итраконазол и его гидроксильированный 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 зигомицетов 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].

Также производные 1,2,4-триазола проявляют антикоррозионную ингибирующую активность. Например, 4-амино-5-меркапто-3-метил-1,2,4-триазол, 4-амино-5-меркапто-3-этил-1,2,4-триазол и 4-амино-5-меркапто-3-пропил-1,2,4-триазол физически адсорбируются на поверхности сплава Мунтца (Cu:Zn 60:40) и способны ингибировать его коррозию в кислой и нейтральной среде.

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, наибольшую эффективность такие соединения проявляют в противогрибковой терапии.

1.1.2. Лекарственные препараты на основе урацила

Фармакологическая активность азотсодержащих гетероциклических соединений объясняется не только их реакционной способностью, но и тем, что они присутствуют в живых организмах. Например, азотистые основания, входящие в состав РНК и ДНК, являются главным строительным материалом любого организма. Тимин и урацил – нуклеос основания из группы кислородсодержащих производных пиримидина, также играют важную роль в нормальном функционировании и развитии нервной системы, поскольку нарушения пуринергической передачи могут приводить к психическим и нейродегенеративным расстройствам [48,49]. Нуклеос основания 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 успешно 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 противораковых препаратов 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 процесс 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 (MTT-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 гидролизуется 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 терапию на дому.

Для лечения колоректального рака, метастазирующего в печень, хорошо зарекомендовал себя препарат флоксуридин (5-фтор-2'-дезоксифлуридин). Действие вещества 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'-дезокситидин) приводит к повышению эффективности терапии при лечении рака, в том числе и 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 снизить токсический эффект 5-фторурацила, возникающий 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-дигидро-пиримидин-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, мочева 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, либо ингибировать действие важных для метаболизма ферментов.

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 []. Действие противовирусных и антибактериальных препаратов нуклеозидного типа значительно усиливается при совместном приёме с ингибиторами *hPNP* [87].

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 с пикомолярными константами диссоциации [88].

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 С8 пурина

изменяется биологическая активность соединений [...]. Введение трифторметилфенила, 4-метоксифенила и 4-фторфенила позволило добиться значений $IC_{50} < 10$ мкМ в отношении клеточных линий печени (HUN7). (опиши, что это значит вообще?)

1.2 Физико-химические методы анализа лекарственных препаратов

Поскольку азотсодержащие гетероциклы входят в состав многих лекарственных препаратов, то они являются и компонентами их метаболитов [89]. 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 [90,91]. 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 [92–94]. 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 [95]. Однако для сложных смесей, например, плазмы или мочи, этих методов часто недостаточно: компоненты могут

перекрываться по сигналам, а концентрация аналита — быть слишком низкой [95–97].

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 [98,99]. Однако для большинства лекарственных гетероциклических соединений на практике используют жидкостную хроматографию, поскольку она позволяет разделять полярные и термолабильные соединения без перевода их в летучую форму [100,101]. Капиллярный электрофорез также применяют для разделения ионизируемых веществ: движение аналитов в электрическом поле зависит от заряда и размера молекул [102,103]. 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 [103,104]. 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 [105].

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 [106–108]. 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 [109–111].

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 [112]. Объектами исследования были выбраны лекарственные соединения на основе имидазола (климбазол, ланоконазол, бифоназол, бутконазол, оксиконазол, 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.

1.2.1 Типы сорбентов, обеспечивающие оптимальную селективность разделения смесей гетероциклов методом обращённо-фазовой ВЭЖХ

Согласно основным представлениям о механизмах, реализуемых в условиях жидкостной хроматографии, удерживание органических соединений на поверхности сорбентов определяется межмолекулярными взаимодействиями, зависящими от химического состава и геометрического строения молекул [113]. В отличие от газовой хроматографии, в жидкостной подвижная фаза выполняет не только транспортную функцию, но и является активным участником хроматографического процесса. Поэтому разделение в условиях ВЭЖХ представляет собой разность конкурентных взаимодействий между сорбатом, сорбентом и элюентом. Большинство моделей, разработанных для жидкостной хроматографии, рассматривает процесс адсорбции молекул на поверхности неподвижной фазы за счёт предшествующей этому десорбции молекул растворителя в объём элюента с освобождением вакантного места.

В режиме обращённо-фазовой ВЭЖХ взаимодействия между сорбатом и сорбентом определяются действием неспецифических дисперсионных, а также электростатических индукционных взаимодействий, и характеризуются липофильностью и поляризуемостью молекул. Наличие в структуре молекул сорбата различных функциональных групп и особенности химического строения полярных молекул способствуют появлению диполь-дипольных взаимодействий и/или водородных связей с молекулами растворителя, что также повлияет на силу связывания с поверхностью сорбента.

Исследуемые производные азотсодержащих гетероциклических соединений – это сложные полифункциональные молекулы, содержащие в своём составе несколько сорбционно-активных центров, способных взаимодействовать не только с неподвижной фазой, но и с молекулами элюента.

Ввиду особенностей строения своей поверхности, ОДС довольно выгодно отличается от других неорганических и полимерных сорбентов. К преимуществам ОДС можно отнести его неподверженность набуханию, способность обеспечения высокой скорости установления сорбционного равновесия, а также наличие возможности лёгкой и обратимой сорбции компонентов с его поверхности под действием небольших объемов растворителей [114,115]. На поверхности немодифицированного силикагеля существует три основных типа групп: силанольные, силандиольные и силоксановые (рис. 1.1), которые отличаются по своей химической природе и реакционной способности.

В то же время в ходе взаимодействия с поверхностными силанольными группами и за счет капиллярной конденсации наблюдается сорбция воды, содержащейся в растворе, на поверхности силикагеля (рис. 1.2), в результате чего образуется полимолекулярный слой воды, под которым обычно подразумевают три слоя. Каждый из них имеет разную силу связанности с поверхностью матрицы, но наиболее сильно связанным с поверхностью оказывается первый слой, т.к. образуется за счет водородных связей.

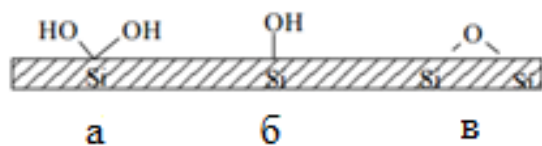


Рис. 1.1. Основные типы групп поверхности силикагелей:
а) силандиольные, б) силанольные,
в) силоксановые [115].

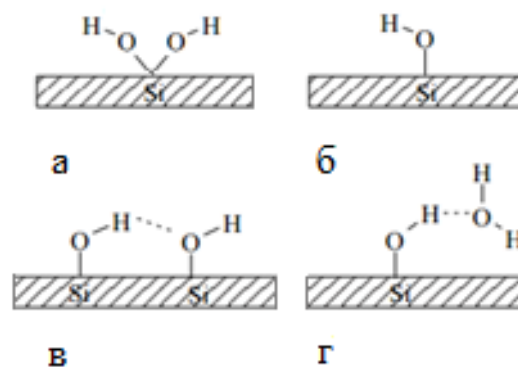


Рис. 1.2. Типы гидроксильных ОН-групп на поверхности силикагеля:
а) геминальная, б) свободная,
в) реакционноспособная, г)
связанная [115].

С помощью соответствующих химических реакций с поверхностными силанольными группами можно получить сорбенты с новыми хроматографическими свойствами. Привитую группу можно изменить путём введения в её состав различных функциональных групп, обеспечив тем самым наличие селективности неподвижной фазы. Получение ОДС основано на процессе модификации поверхности обычного силикагеля, за счет прививки по связям $-\text{Si}-\text{C}-$ алкильной группы C_{18} , путём взаимодействия чаще всего с октадецилтрихлорсиланом (рис. 1.3) или метилоктадецилдихлорсиланом и диметилоктадецилхлорсиланом [116,117]. При этом плотность прививки органической фазы значительно зависит от способа получения и может колебаться от 4 до 18% в пересчете на углерод, а при использовании специальных методов, плотность прививки может достигать 25-30% углерода [118]. Степень покрытия поверхности модификатором лежит в диапазоне примерно 10 – 70%, в лучших случаях – 95%.

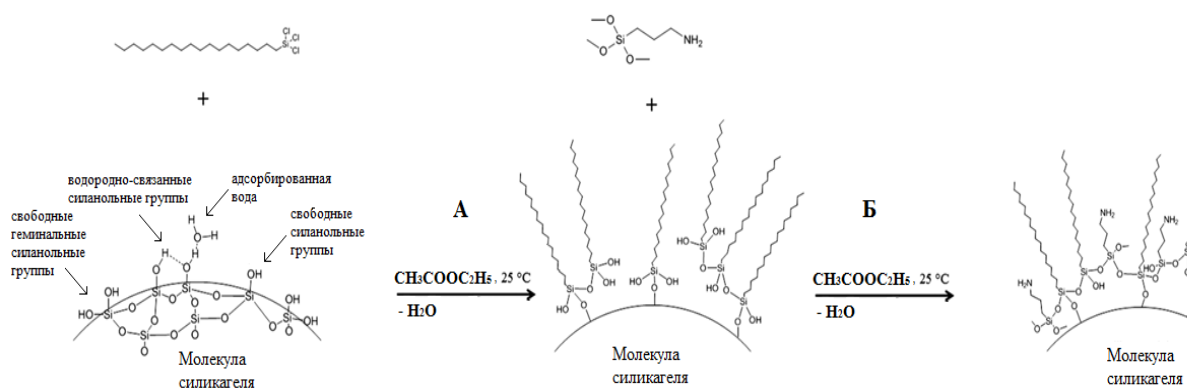


Рис. 1.3. Стадии модификации поверхности микрочастицы силикагеля [119]: а) реакция октадецилтрихлорсилана с реакционноспособными силанольными группами на поверхности молекулы силикагеля, б) реакция остаточных гидроксигрупп на гидрофобизированных микрочастицах с аминопропилтриметоксисиланом.

При этом удерживание на таких сорбентах возможно за счёт: адсорбции молекул на внешней поверхности; в объеме привитого слоя; взаимодействия молекул с остаточными силанольными группами поверхности ОДС (рис. 1.5) [120].

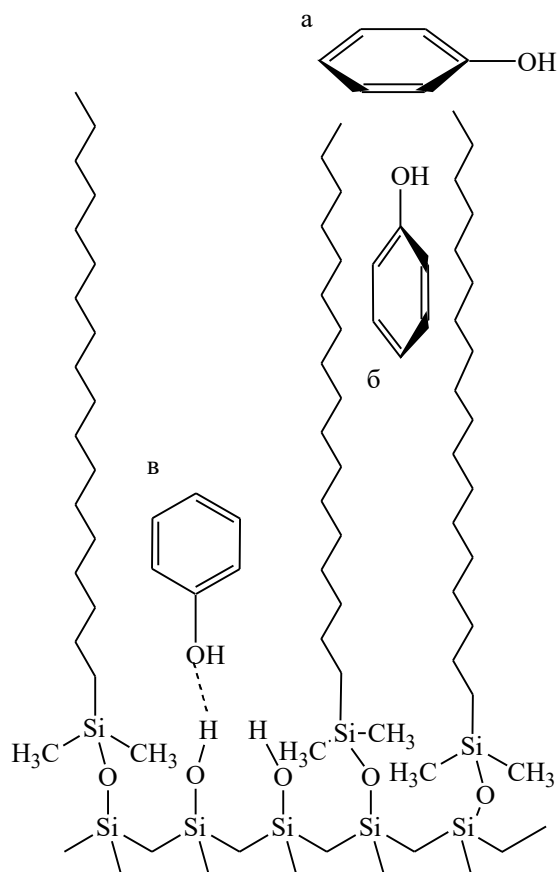


Рис. 1.5 Виды взаимодействий сорбента и октадецилсиликагеля на примере сорбции фенола: а) адсорбция на внешней поверхности привитого слоя; б) адсорбция в объёме поверхностного слоя; в) сорбция за счёт взаимодействия с остаточными силанольными группами

Большой популярностью в хроматографическом анализе пользуются колонки, заполненные частицами силикагеля с привитыми цианопропильными группами. Такой сорбент 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. Удерживание полярных соединений на поверхности неподвижной фазы осуществляется за счёт взаимодействий с циано-группой.

Первые попытки создания сорбента, отличающегося однородностью поверхности, были предприняты в начале 1970-х годов, однако полученная неподвижная фаза обладала довольно низкой хроматографической эффективностью и широким размытием пиков при низких концентрациях органического модификатора в фазе. Позднее, в 1979 году Нокс и Гилберт [121] предложили новый процесс синтеза и получили пористый графитовый углерод (гиперкарб), который показал, как хорошую механическую стабильность, так и довольно высокую хроматографическую производительность и воспроизводимость. Суть данного способа синтеза заключалась в пропитывании мезопористого силикагеля для ВЭЖХ фенолформальдегидным олигомером, дальнейшей карбонизации в потоке инертного газа при 1000 °С и с последующим растворением силикагельного темплата в щелочном растворе. Так был получен «пористый стеклоуглерод», содержащий микропоры, вследствие чего отличался низкой эффективностью в ВЭЖХ. При последующем двух – трёхкратном повышении температуры (обжиге) из структуры материала удаляются микропоры, происходит его графитизация [122].

Поверхность, а соответственно и свойства полученного в ходе такой реакции пористого графитированного углерода, разительно отличаются от свойств исходной матрицы, однако все же наблюдаются некоторые корреляции. Таким образом, можно синтезировать сорбент с определенными размерами и формой пор, а также моделировать необходимые поверхностные свойства, влияя, таким образом, на его хроматографические характеристики.

В настоящее время самый популярный сорбент на основе пористого графитированного углерода выпускается компанией Thermo Electron Corporation под торговым наименованием «Hypersorb» – гиперкарб.

Сорбенты для таких колонок также получают путём карбонизации, однако имеется ряд отличий в условиях проведения эксперимента. 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. Такой плавный нагрев помогает добиться более упорядоченной полимерной структуры, что позволяет более полно провести процесс карбонизации.

После насыщения углеродом полимер подвергают пиролизу в инертной атмосфере азота при 1000°C, получая высокопористый аморфный углерод, который обычно называют «сажей». Такая структура углерода иммобилизована, поэтому надобность в силикагельной матрице пропадает, и её растворяют в горячем водном растворе калия, осуществляя графитирование путём термической обработки при 2340°C в инертной атмосфере аргона. В результате происходит структурная перегруппировка и закрытие микропор.

После охлаждения до 1000°C, с целью создания более однородной поверхности, проводят её дезактивацию в токе водорода, молекулы которого взаимодействуют с остаточными свободными радикалами, присутствующими на углеродной поверхности.

Характерное отличие гиперкарба от других сорбентов, в частности от ОДС, заключается в отсутствии каких-либо функциональных групп. По структуре он представляет собой проводящий электричество кристаллический материал, состоящий из переплетенных между собой графитовых лент, чередующихся сложным образом. При этом сами графитовые слои состоят из гексагонально расположенных sp^2 -гибридизованных атомов углерода, связанных между собой ковалентными связями и удерживаются за счет ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, все это и обуславливает высокую жесткость и механическую устойчивость данной матрицы (рис. 1.6) [123]. Также авторы работы приводят снимок просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМВР) структуры кристаллитов гиперкарба (рис. 1.7). По данным снимка авторы рассчитали, что каждый кристаллит построен примерно из 30

графитовых листов, расстояние между которыми составляет примерно 3.30 – 3.40 Å.

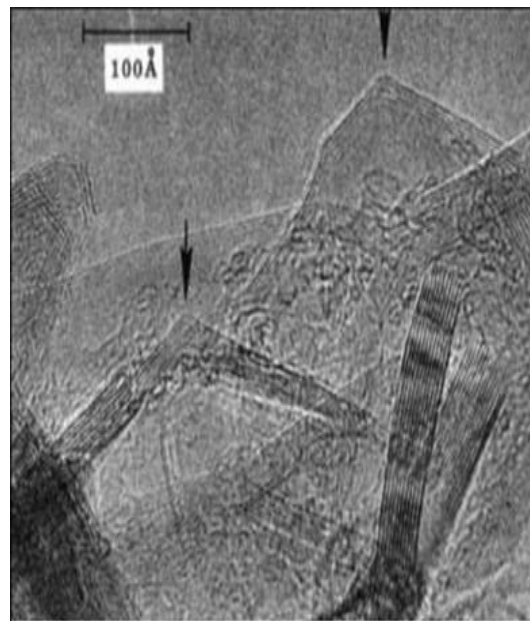
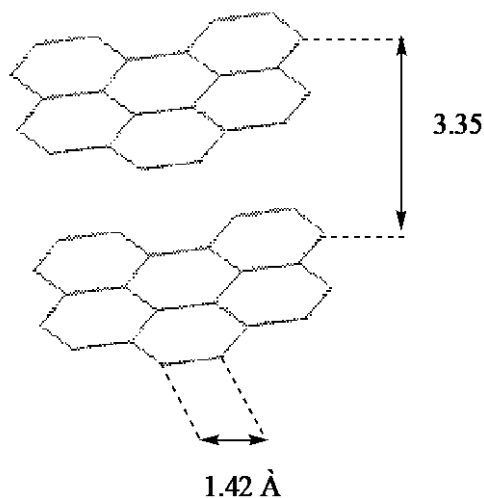


Рис. 1.6 Структурная формула графитовых слоёв гиперкарба [117] Рис.1.7 ПЭМВР-снимок углеродных кристаллитов гиперкарба [123]

Однако за счет нерегулярной ориентированности последовательных слоев строение гиперкарба не соответствует структуре реального трехмерного графита, для которого наблюдается регулярное чередование в положении последовательных плоскостей. Таким образом, гиперкарб относят к «двумерным», графитам. В то же время структура гиперкарба схожа с графитированной термической сажой (ГТС), однако она прочнее за счёт связи кристаллитов слабыми дисперсионными силами.

В целом, механизм сорбции на гиперкарбе подчиняется закономерностям ОФ варианта ВЭЖХ. Однако вклад в удерживание могут вносить делокализованные π -электроны графита, что в сочетании с высокой поляризуемостью углерода способствует сильным дисперсионным взаимодействиям. Они вступают в конкуренцию с дисперсионными взаимодействиями компонентов подвижной фазы с поверхностью гиперкарба.

Удерживание на гиперкарбе также определяется гидрофобными взаимодействиями в водно-органических растворах, приводящими к выталкиванию сорбатов из подвижной фазы. Наличие и тип поляризованных функциональных групп, контактирующих с поверхностью сорбента, в молекулах аналитов несомненно будет сказываться на увеличении энергии межмолекулярного взаимодействия. В то же время более плоские структуры теснее взаимодействуют с поверхностью сорбента за счёт большого числа контактов, что приводит к росту хроматографических параметров удерживания в сравнении с не плоскими молекулами, обладающих меньшим удерживанием. Иными словами, существует некий стерический фактор, который также оказывает влияние на разделение, что особенно актуально для структурных аналогов.

Ввиду особенностей строения гиперкарб является гораздо более гидрофобной фазой, чем типичные обращенно-фазовые сорбенты, поэтому при сорбции на нем 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.

Адсорбция на пористом графитированном углероде определяется не только действием дисперсионных сил, но и в большей степени электростатических и индукционных. Кроме того, дополнительный вклад 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 и многих других.

1.2.2 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 tandemной масс-спектрометрии, однако их поведение при разделении определяется всей структурой молекулы, а не только наличием триазольной группы [124].

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) [125]. 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 [126]. 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 [127]. 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 [128,129]. 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 [130]. 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.

1.2.3 Анализ производных урацила 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 аналита и состав смеси, а затем подбирают тип неподвижной фазы [131].

Для полярных производных подходят колонки для гидрофильной хроматографии (HILIC), например, с амидной, аминной или цвиттерионной фазой [132–134]. Также можно испытывать пористый графитированный углерод: он обеспечивает иной механизм удерживания и может улучшить разделение близких по структуре веществ [135,136]. 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 аналита. Для количественного анализа на тройном квадрупле обычно применяют режим MRM. При анализе биологических проб важны не только разделение, но и влияние матрицы на ионизацию [137].

...

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 [...].

В основе квантово-химических расчётов лежит понятие об электронной структуре молекул и точное решение стационарного уравнения Шрёдингера [138]:

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

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) [139]. 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 [140]. 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 Слейтера.

...

Азотсодержащие гетероциклы встречаются во многих лекарственных соединениях. К ним относятся производные триазола, урацила и азотистых нуклеозидов. Их свойства зависят не только от состава молекулы, но и от распределения электронной плотности, таутомерного состояния, протонирования, геометрии и способности образовывать водородные связи. Квантово-химические расчёты позволяют оценивать эти характеристики и связывать их с физико-химическими свойствами, реакционной способностью и биологической активностью.

В обозначениях QSRP и QRAR нет единого употребления во всех областях химии. В этой статье QSRP трактуется как количественная зависимость «структура — свойство» (quantitative structure–property relationship), а QRAR — как количественная связь между реакционной способностью и активностью (quantitative reactivity–activity relationship). QSAR означает количественную зависимость «структура — активность». Эти подходы близки, но отвечают на разные вопросы: QSRP прогнозирует свойства вещества, QRAR связывает его реакционную способность с эффектом, а QSAR оценивает биологическую активность.

Почему для гетероциклов важны квантово-химические расчёты

Обычные структурные дескрипторы — молекулярная масса, число доноров и акцепторов водородной связи, липофильность — удобны для сравнения соединений. Однако они не всегда отражают тонкие электронные различия. Например, замена одного заместителя в триазольном кольце может изменить распределение заряда и основные центры молекулы, а значит — повлиять на протонирование, растворимость или взаимодействие с белком.

Для урацила и его производных важен выбор таутомерной формы: разные формы могут отличаться положением протонов и двойных связей. У

азотистых нуклеозидов на результат также влияют конформация сахара, ориентация гликозидной связи и состояние молекулы в растворе. Если модель строится для неподходящей таутомерной или протонированной формы, её прогнозы могут оказаться ненадёжными. Поэтому расчёты полезно начинать с проверки состава, зарядового состояния и возможных форм соединения.

Квантовая химия помогает вычислять геометрию и электронные характеристики молекул. При этом расчёт не заменяет эксперимент и не даёт прямого ответа на вопрос, будет ли вещество лекарством. Его ценность — в том, что он добавляет к модели химически интерпретируемые признаки и помогает проверять гипотезы о механизме действия, реакционной способности или связывании с мишенью.

Обзор расчётных методов для азотсодержащих гетероциклов

Для первичной оптимизации геометрии и скрининга крупных наборов соединений применяют полуэмпирические методы и методы с поправками на плотность, например GFN2-xTB. Они обычно требуют меньше вычислений, чем теория функционала плотности, но их точность зависит от класса молекул и выбранного свойства. Поэтому результаты полуэмпирических расчётов для триазолов, урацилов или нуклеозидов желательно проверять на репрезентативной части набора более точным методом.

Для уточнения геометрии и электронных характеристик часто используют теорию функционала плотности (DFT). Например, функционалы семейства B3LYP и методы с поправками на дисперсию применяют для расчёта электронной плотности, энергий орбиталей и молекулярных дипольных моментов. При выборе уровня теории важно учитывать цель: оптимизация геометрии, оценка относительной устойчивости таутомеров, расчёт зарядов или описание взаимодействия с растворителем. Один и тот же метод не обязательно одинаково хорошо решает все эти задачи.

Для водных сред и других растворителей используют модели неявной сольватации, в том числе SMD. Они позволяют учитывать влияние среды без явного включения каждой молекулы растворителя, но не описывают все специфические водородные связи. Когда такие взаимодействия критичны, например при сравнении таутомеров или оценке связывания с участием воды, может потребоваться включить в модель отдельные молекулы растворителя. Важна и конформационная выборка: расчёт одной оптимизированной структуры не всегда представляет гибкую молекулу в растворе.

К полезным вычисляемым признакам относятся частичные заряды, дипольный момент, поляризуемость, энергия граничных орбиталей, электростатический потенциал, площади и объёмы молекулы. Для QRAR могут быть информативны энергии переходных состояний, барьеры реакции, индексы электрофильности и нуклеофильности, а также рассчитанные скорости или константы реакций. Однако реакционная способность зависит от условий эксперимента — растворителя, pH, температуры и состава среды. Эти условия следует учитывать при интерпретации расчётов.

Методические основы таких вычислений описаны, например, в оригинальной работе по модели сольватации SMD Маренича и соавторов и в статье Ниде о программной системе ORCA. Эти публикации относятся к вычислительным методам, а не к QSAR-моделям именно для триазолов или нуклеозидов.

QSRP-модели: прогноз свойств по структуре

В QSRP-моделях откликом служит измеряемое свойство, а не биологическая активность. Для лекарственных гетероциклов такими откликами могут быть растворимость, липофильность, кислотность, основность, проницаемость или спектральные параметры. Квантово-химические признаки добавляют к обычным дескрипторам, чтобы учесть электронное строение молекулы. Например, расчётные заряды и

электростатический потенциал могут помочь объяснить различия в кислотно-основных свойствах близких по составу соединений.

Для урациловых производных и нуклеозидов особенно важно, чтобы экспериментальное свойство и расчётная структура относились к сопоставимым условиям. Растворимость при одном значении pH нельзя без дополнительной проверки напрямую сравнивать с растворимостью, измеренной при другом. Аналогично расчёт нейтральной формы не следует без оговорок сопоставлять с экспериментом для преимущественно ионизованного вещества. Данные стоит разделять по протонированию, таутомерии и, где это возможно, по методике измерения.

QSRP-модель может быть линейной, например построенной методом наименьших квадратов, или нелинейной — например на основе случайного леса либо опорных векторов. Выбор алгоритма сам по себе не гарантирует хорошего прогноза. Необходимы проверка качества на независимой выборке, анализ области применимости и контроль того, что модель не использует случайные корреляции. При небольшом наборе соединений простая модель с понятными признаками часто полезнее сложной, но трудно интерпретируемой.

QRAR-модели: от электронной структуры к реакционной способности

В QRAR-подходе квантово-химические признаки связывают с реакцией или реакционно обусловленным биологическим эффектом. Для азотсодержащих гетероциклов это может быть применимо, если действие соединения связано с химическим превращением, образованием ковалентной связи или реакцией с нуклеофилом. В таком случае исследуют, например, электронную доступность реакционного центра, энергию активации или устойчивость промежуточных состояний.

Важно не приписывать соединению реакционный механизм только на основании рассчитанных орбиталей или зарядов. Такие признаки помогают сформулировать гипотезу, но механизм подтверждают

экспериментальными данными. Если биологический эффект обусловлен главным образом обратимым связыванием с белком, QRAR может быть менее уместен, чем QSAR-модель, основанная на признаках геометрии, зарядах.

Выводы по Главе 1

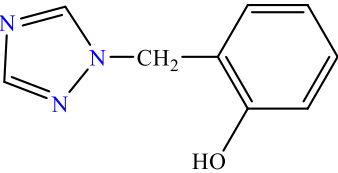
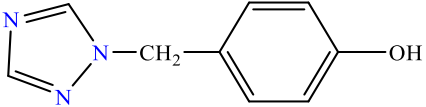
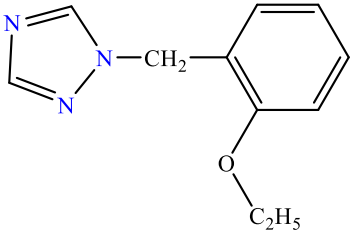
Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Объекты исследования

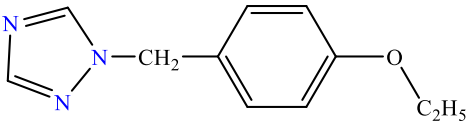
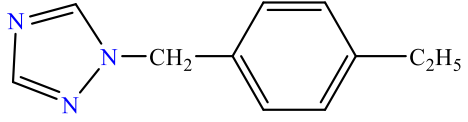
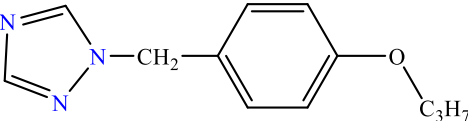
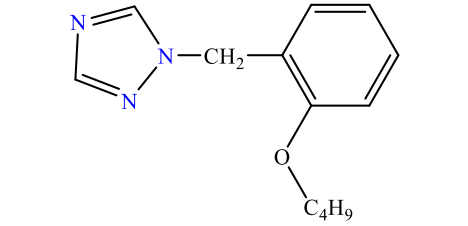
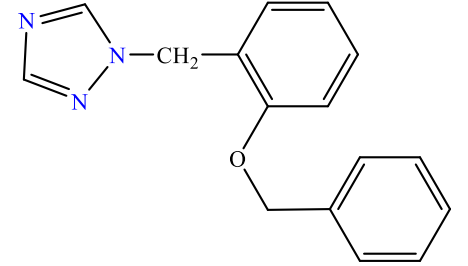
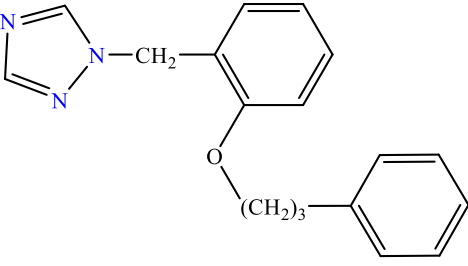
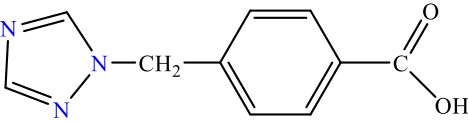
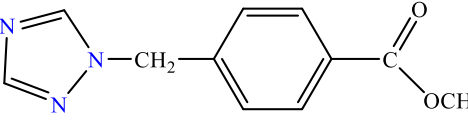
2.1.1 Производные 1,2,4-триазола

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

Продолжение таблицы 2.1

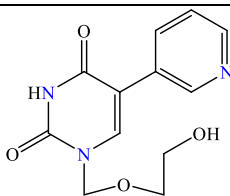
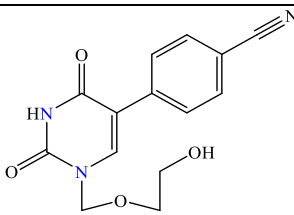
T4	1-[4-(бензилокси)этил]- 1Н-триазол		$C_{11}H_{13}N_3O$ 203.11
T5	1-[4-(бензил)этил]- 1Н-триазол		$C_{11}H_{13}N_3$ 187.11
T6	1-[4-(бензилокси) пропил]-1Н-триазол		$C_{12}H_{15}N_3O$ 217.12
T7	1-[2-(бензилокси)бутил]- 1Н-триазол		$C_{13}H_{17}N_3O$ 231.14
T8	1-[2-(бензилокси)бензил]- 1Н-триазол		$C_{16}H_{15}N_3O$ 265.12
T9	1-[2-(бензилокси) бензопропил]-1Н- триазол		$C_{18}H_{19}N_3O$ 293.15
T10	4-[1Н-1,2,4-триазол- 1-илметил] бензойная кислота		$C_{10}H_9N_3O_2$ 203.07
T11	4-[1Н-1,2,4-триазол- 1-илметил] метилбензоат		$C_{11}H_{11}N_3O_2$ 217.09

2.1.2 Производные урацила

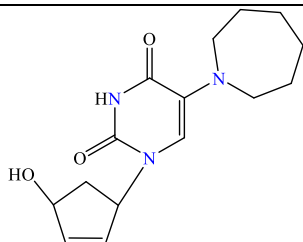
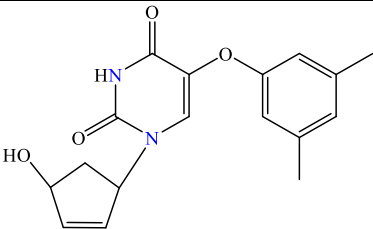
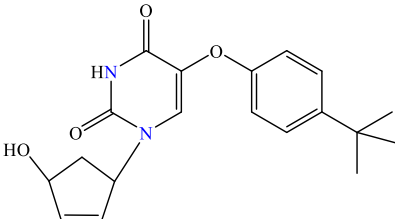
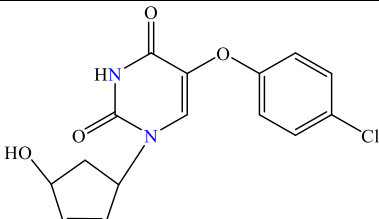
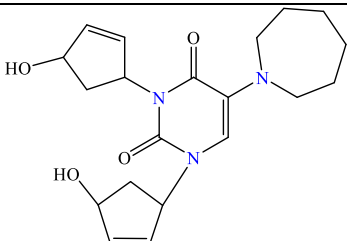
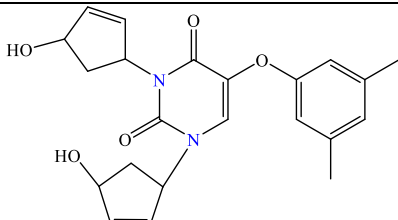
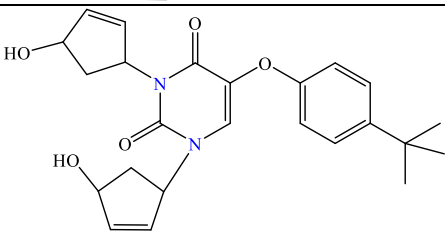
Изучение удерживания методом ОФ ВЭЖХ и процессов фрагментации в условиях тандемной масс-спектрометрии проводили с использованием производных урацила – соединений, в структуре которого содержится шестичленный гетероциклический фрагмент. Объекты исследования синтезированы в лаборатории Молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [141]. 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.

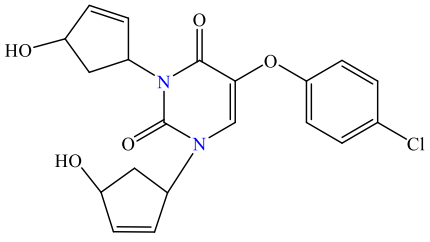
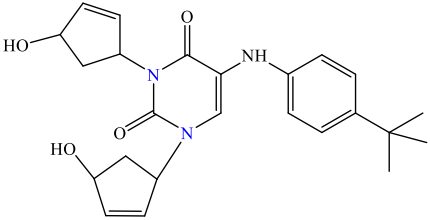
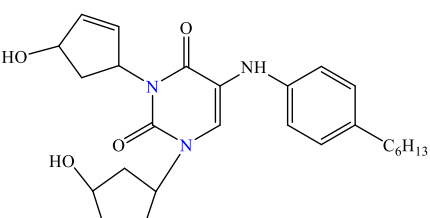
Таблица 2.2. Исследуемые производные урацила

№	Название	Структурная формула	Брутто-формула и молекулярная масса, Да
У1	1-((2-гидроксиэтокси) метил)-5-(пиридин-3-ил) пиримидин-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-тетрагидропиримидин-5-ил) бензонитрил		C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ 287.09

Продолжение таблицы 2.2

У3	5-(азепан-1-ил)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{15}H_{21}N_3O_3$ 291.16
У4	5-(3,5-диметилфенокси)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{17}H_{18}N_2O_4$ 314.13
У5	5-(4-(трет-бутил)фенокси)-1-(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{19}H_{22}N_2O_4$ 342.16
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

Продолжение таблицы 2.2

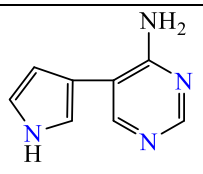
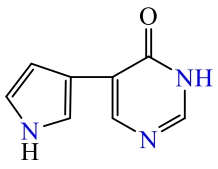
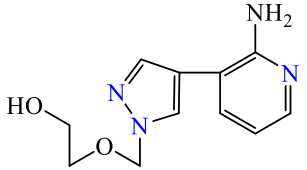
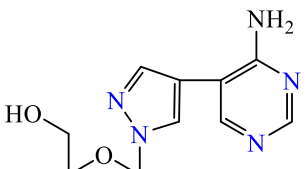
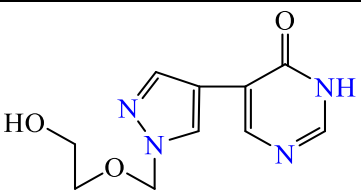
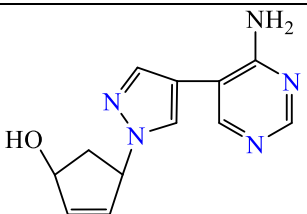
У10	5-(4-хлорфенокси)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{20}H_{19}N_2O_5Cl$ 402.10
У11	5-((4-(трет-бутил)фенил)амино)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{24}H_{29}N_3O_4$ 423.22
У12	5-((4-гексилфенил)амино)-1,3-бис(4-гидроксициклопент-2-ен-1-ил) пиридин-2,4(1H,3H)-дион		$C_{26}H_{33}N_3O_4$ 451.25

2.1.3 Флексимерные производные азотсодержащих гетероциклов

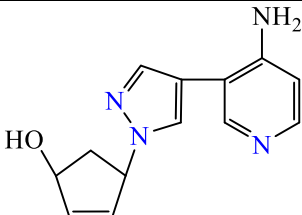
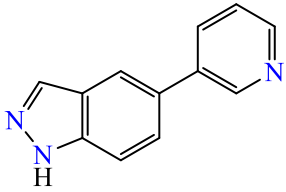
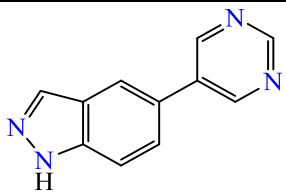
Изучение удерживания методом ОФ ВЭЖХ и процессов фрагментации в условиях тандемной масс-спектрометрии проводили с использованием соединений, содержащих в своём составе два гетероциклических фрагмента, соединённых углерод-углеродной связью. Объекты исследования синтезированы в лаборатории Молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [142,143]. 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 флаконах 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) пиримидин-4-амин		$C_8H_8N_4$ 160.08
П2	5-(1H-пиррол-3-ил) пиримидин-4(3H)-он		$C_8H_7N_3O$ 161.06
П3	2-((4-(2-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол		$C_{11}H_{14}N_4O_2$ 234.11
П4	2-((4-(4-аминопириимдин-5-ил)-1H-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол		$C_{10}H_{13}N_5O_2$ 235.11
П5	5-(1-((2-гидроксиэтокси)метил)-1H-пиразол-4-ил)пиримидин-4(3H)-он		$C_{10}H_{12}N_4O_3$ 236.10
П6	4-(4-(4-аминопиридин-5-ил)-1H-пиразол-1-ил)циклопент-2-ен-1-ол		$C_{12}H_{13}N_5O$ 243.11

Продолжение таблицы 2.3

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% (PanReas AppliChem, Германия) и деионизированной воды, полученной с применением системы очистки Milli-Q (Merck, Германия) и АКВАЛАБ 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 в режиме электрораспыления

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. Фотоионизирование

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-дигидроксibenзойную 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) [144,145]. 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.

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 функционала плотности B3LYP/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 $M + H^+ \rightarrow MH^+$:

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

а изменение энтальпии ΔH° вычисляется как

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

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 [146].

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 [147]. 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 [148,149]. 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 хТВ в рамках теории функционала плотности [150]. Расчёт энергетических параметров осуществлялся на основе методов GFNn-хТВ (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.

$$\Delta G_T^\circ = \Delta H_T^\circ - T\Delta S_T^\circ = -RT\ln K \quad (1)$$

$$\left(\frac{\ln K}{d \left(\frac{1}{T} \right)} \right)_p = - \frac{\Delta H_T^\circ}{R}, \quad (2)$$

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):

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}, \quad (3)$$

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:

$$\ln k = - \frac{\Delta H_T^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_T^\circ}{R} + \ln \beta, \quad (3)$$

где β – фазовое отношение хроматографической колонки, определяемое как отношение объёма элюента (V_M) к объёму неподвижной фазы (V_S) по методу [151].

Экспериментальное вычисление констант Генри адсорбции ($K_{1,C}$) производных 1,2,4-триазола на поверхности ПГУ осуществляли по линейному уравнению (4) [113]:

$$\ln K_{1,C} = - \frac{\Delta H_T^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_T^\circ}{R}. \quad (4)$$

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 [152]. 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 [153]. 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 [154]. 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) [155–157]:

$$K_{1,c} = \frac{V}{A} \cdot \frac{N_{\text{адс}}}{N_{\text{об}}} = \frac{V \int_{\text{адс}} e^{\frac{-(\Phi_{\text{вн}}(\vec{r}) + \Phi_{\text{адс}}(\vec{r}))}{kT}} d\vec{r}}{A \int_{\text{об}} e^{\frac{-\Phi_{\text{вн}}(\vec{r})}{kT}} d\vec{r}}, \quad (5)$$

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 смешения, описывающие

взаимодействие с поверхностью ГТС, проводились с использованием силового поля GAFF (General Amber Force Field) [158]. Адсорбционное взаимодействие молекул гетероциклов с поверхностью ГТС описывалось атом-атомными потенциалами в форме Леннард-Джонса для каждого атома молекул азолов, аналитически проинтегрированных относительно графитовых слоёв [159].

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 таблице 3.1.

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.

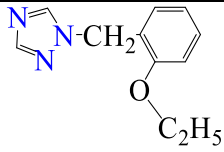
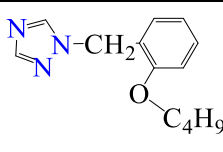
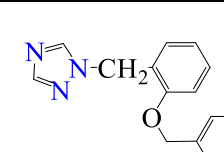
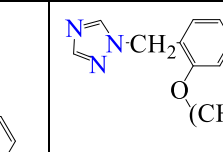
Так, например, установлено, что при введении в структуру гетероциклов гидроксильной группы наблюдается снижение численных значений липофильности и поляризуемости молекул, причём изменения данных параметров симбатны. В случае 2-(1Н-триазол-1-илметил)фенола (**T1**) и 4-(1Н-триазол-1-илметил)фенола (**T2**), 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 **T3** – 1-[2-(бензилокси)этил]-1Н-триазол) приводит к возрастанию липофильности и поляризуемости. Увеличение длины углеводородного заместителя (**T7** – 1-[2-(бензилокси)бутил]-1Н-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 пиразольным 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 **T1** и **T2**) также, как и положение этокси-группы (соединения **T3** и **T4** – 1-[4-(бензилокси)этил]-1H-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 1). 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.

Таблица 3.5. 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

...

3.1.2 Вычисление топологических параметров производных пиридина и пиримидина

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

Таблица 3.4. Топологические индексы исследуемых производных урацила

№	<i>Zag1</i>	<i>J</i>	<i>TPSA</i>	<i>VSA_EState1</i>	<i>PBF</i>
Y1	92	1.87	196	6.28	0.52
Y2	102	1.86	160	6.26	0.65
Y3	110	1.66	148	1.52	0.79
Y4	122	1.59	164	7.03	1.06
Y5	146	1.56	155	2.86	0.97
Y6	134	1.53	163	7.04	1.00
Y7	116	1.56	149	6.83	0.78
Y8	158	1.51	143	8.46	1.06
Y9	170	1.45	129	8.47	1.10
Y10	152	1.49	156	8.23	1.15
Y11	170	1.45	150	2.68	1.02
Y12	172	1.36	164	2.70	0.97

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».

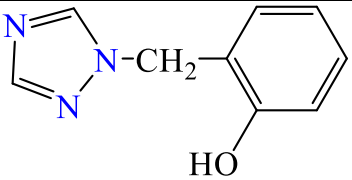
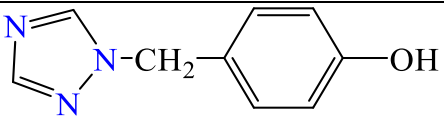
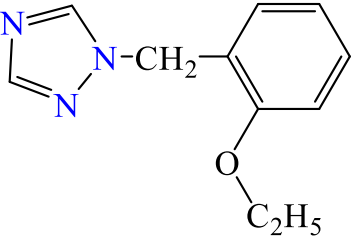
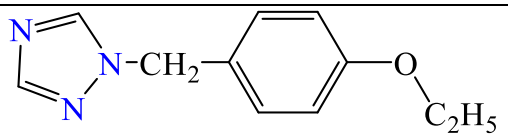
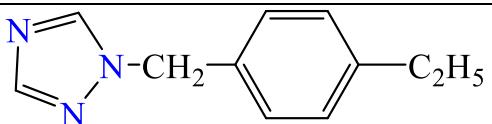
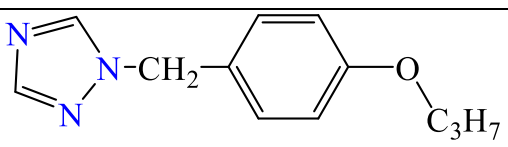
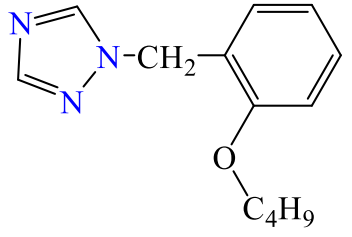
Одним из таких направлений является оптимизация методик разделения структурно близких соединений, являющихся изомерами или гомологами. Однако задачи прогнозирования сорбционного поведения

веществ, в частности содержащих гетероциклические фрагменты, определения порядка выхода веществ из колонки в условиях жидкостной хроматографии на сегодняшний день полностью не решены. Причина этого заключается в совокупности конкурирующих межмолекулярных взаимодействий, реализуемых в хроматографической системе.

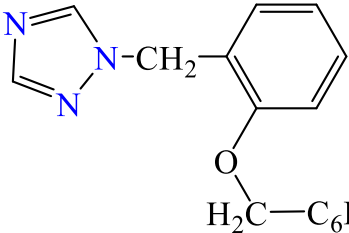
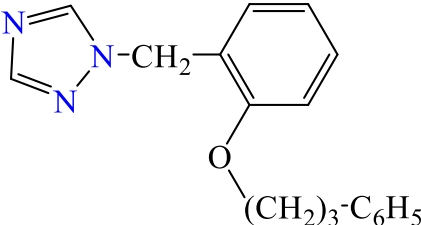
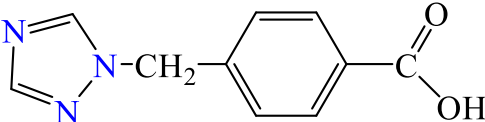
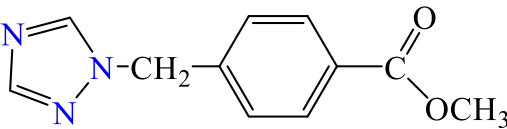
Молекулярно-статистический метод для расчёта констант Генри позволяет учесть дисперсионные взаимодействия, возникающие между молекулой исследуемого соединения и поверхностью ГТС в условиях предельно малых концентраций без учёта компонентов растворителя. В данном случае значения логарифмов констант Генри будут отражать силу взаимодействия адсорбата с плоской углеродной поверхностью: чем выше численное значение $\ln K_{1,C}$, тем более выражено удерживание [153]. Органические молекулы, содержащие ароматические фрагменты, расположенные в одной плоскости, будут иметь наибольшие 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. 3.5). Также для сравнения представлены экспериментальные константы Генри, рассчитанные на основании термодинамических величин по уравнению (4).

Таблица 3.5 – Константы Генри ($\ln K_{1,C}$), полученные молекулярно-статистическим моделированием, значения фактора удерживания, определённые методом жидкостной хроматографии (сорбент: пористый графитированный углерод марки Hypercarb; 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
T7		1.18	2.62	18.14

Продолжение таблицы 3.5

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 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. При этом Результаты расчётов 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.

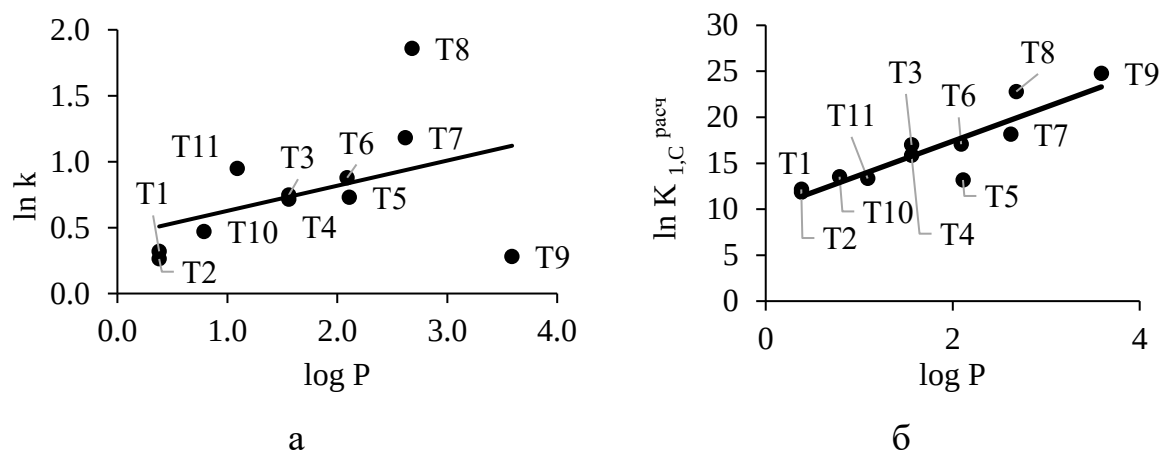


Рис. ... Связь липофильности производных 1,2,4-триазола с экспериментальными хроматографическими (а) и расчётными термодинамическими (б) параметрами адсорбции на ПГУ и ГТС, соответственно.

...

3.1.4 Вычисление энергетических характеристик молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина

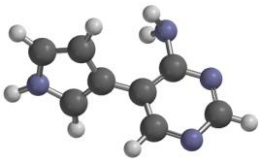
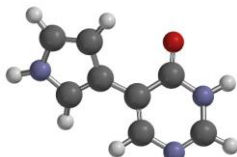
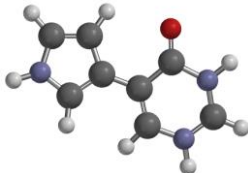
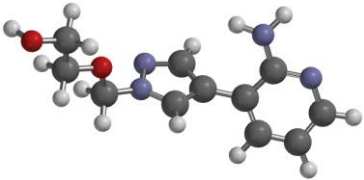
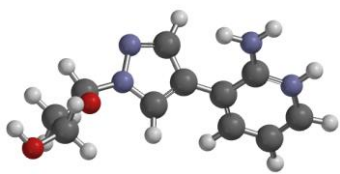
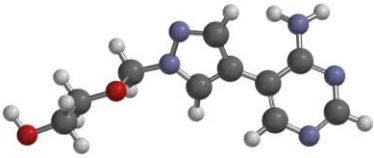
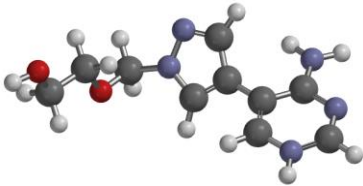
Таблица 3.4. Энергетические параметры исследуемых флексимерных производных пиридина и пиримидина

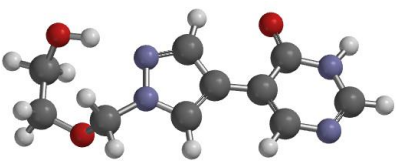
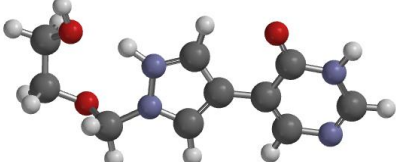
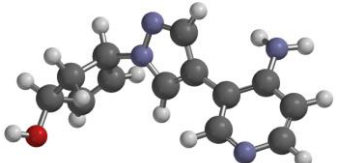
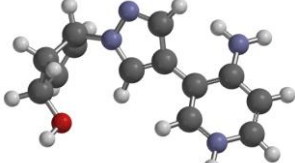
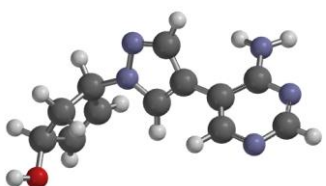
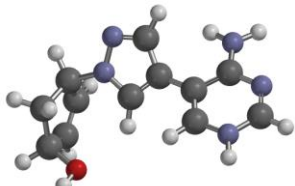
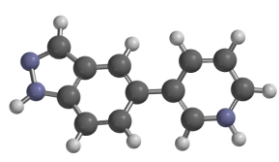
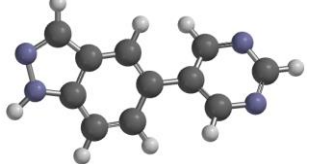
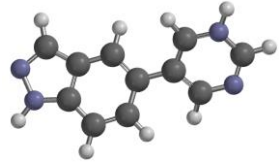
№, п/п	Молекулярная форма	$E(\text{ВЗМО})$	$E(\text{НСМО})$	ΔE	$\Delta E_{\text{Elec}}^{\circ}$	ZPE	РА
П1	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4]$	-8.05	3.39	1103	-528.52	413.53	921
	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4 + \text{H}]^+$	-10.02	-5.60	426	-528.96	451.18	
П2	$[\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}]$	-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, $\Delta E_{\text{Elec}}^\circ$ – Хартри, ZPE – кДж/моль, PA – кДж/моль.

Таблица 3.5. Места протонирования молекул флексимерных производных пиридина и пиримидина, определенные с применением программы CREST

№, п/п	3D-Структурная формула [M]	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

3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография азотсодержащих гетероциклических соединений

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

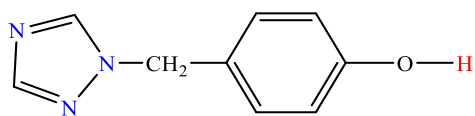
На начальном этапе методом ВЭЖХ проанализированы некоторые производные 1,2,4-триазола в режиме изократического элюирования смесью ацетонитрил – вода на поверхности октадецилсиликагеля. Результаты экспериментально полученных значений фактора удерживания представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. 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

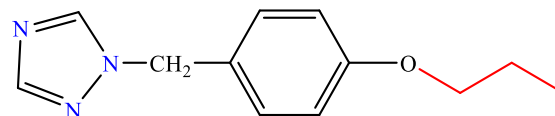
Адсорбция на поверхности октадецилсиликагеля осуществляется преимущественно за счёт дисперсионных взаимодействий. Из полученных данных следует, что производные 1,2,4-триазола на ОДС удерживаются слабо, ввиду возникающих конкурентных взаимодействий с молекулами элюента. Увеличение содержания воды в подвижной 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 (T1 и T2), 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.



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

$$\begin{aligned} \log P &= -0.15 \\ \alpha [\text{\AA}^3] &= 54.47 \\ V [\text{\AA}^3] &= 178.78 \\ S_w [\text{\AA}^2] &= 202.49 \\ PSA [\text{\AA}^2] &= 40.145 \end{aligned}$$



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

$$\begin{aligned} \log P &= 0.78 \\ \alpha [\text{\AA}^3] &= 59.10 \\ V [\text{\AA}^3] &= 235.68 \\ S_w [\text{\AA}^2] &= 264.21 \\ PSA [\text{\AA}^2] &= 27.00 \end{aligned}$$

При сравнении хроматографических и физико-химических параметров производных триазола (соединения **T2** и **T6**) 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]-1H-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.

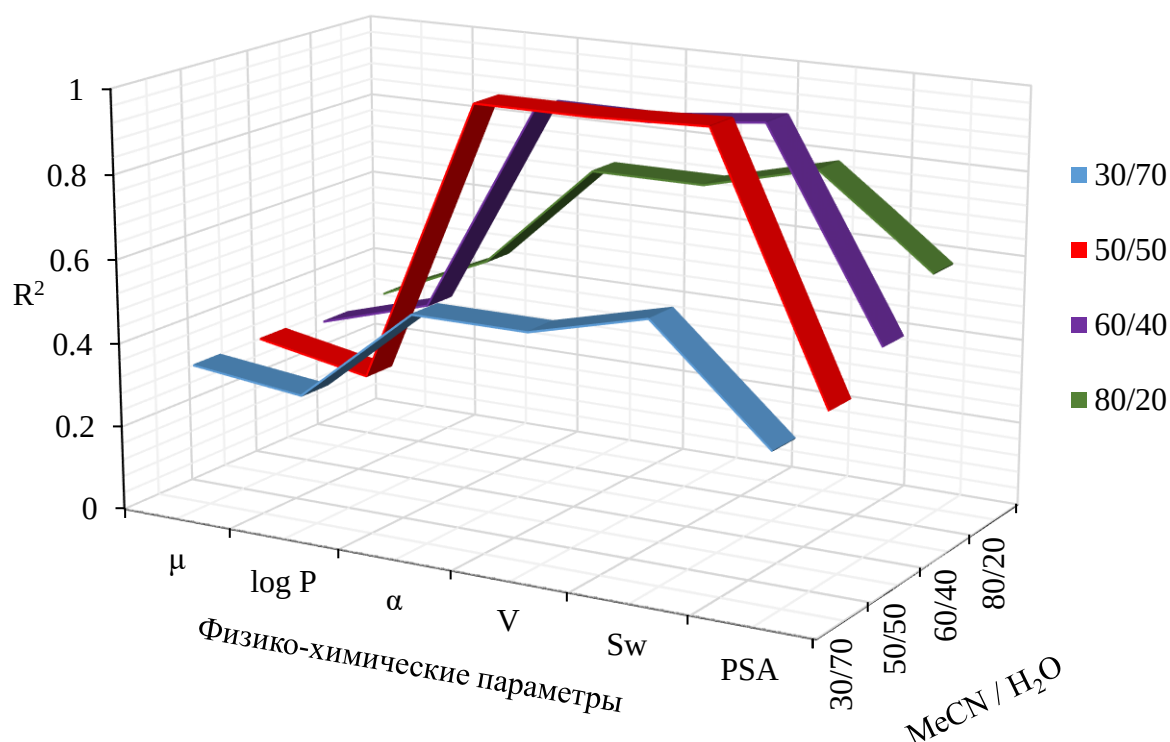


Рис. 3.1 График зависимости коэффициента детерминации уравнений, связывающих факторы удерживания производных 1,2,4-триазола на ОДС, полученные при различных составах элюента, с физико-химическими параметрами молекул

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.)).

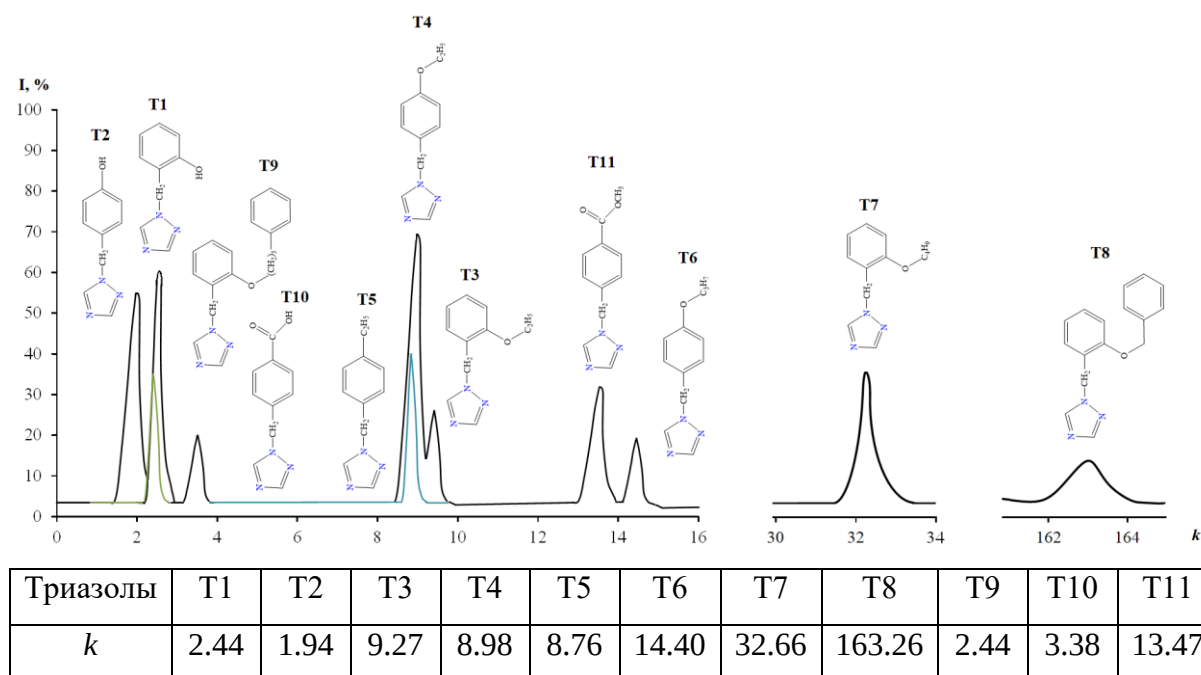


Рис. 3.2 Порядок элюирования и значения факторов удерживания производных 1,2,4-триазола на ПГУ (элюент: ацетонитрил – вода 50/50 % (об.), объёмная скорость потока $F = 250$ мкл/мин, $T_c = 40^\circ\text{C}$)

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 [160].

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]-1Н-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. 3.2).

Таблица 3.2. 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».

Не только присутствие гидроксильных групп в структуре заместителей, но и способность молекулы урацила к кето-енольной таутомерии, оказывают значительное влияние на ...

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: октадецилсиликагеле, цианопропилсиликагеле и пористом графитированном углероде (табл. 3.3).

Таблица 3.3. 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	<i>k</i>		
	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

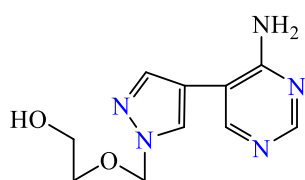
липофильности, следовательно, они гидрофильны. Наличие в структуре amino-, keto- и гидроксильных групп позволяет этим соединениям образовывать водородные связи с молекулами элюента, за счёт чего сила дисперсионных взаимодействий с поверхностью ОДС будет ослабевать.

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-(1H-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.

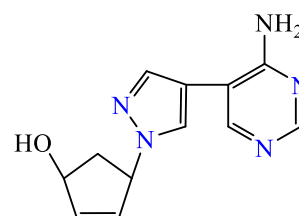
Внедрение в структуру циклического заместителя с кратной связью вместо линейного также приводит к росту удерживания за счёт возникновения межмолекулярных взаимодействий между π -электронными системами гетероцикла и пористого графитированного углерода. В качестве примера можно привести пару аминопроизводных пиримидина **П4** и **П6**: 2-

((4-(4-аминопириимдин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол ($k = 1.67$) и 4-(4-(4-аминопиридин-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).

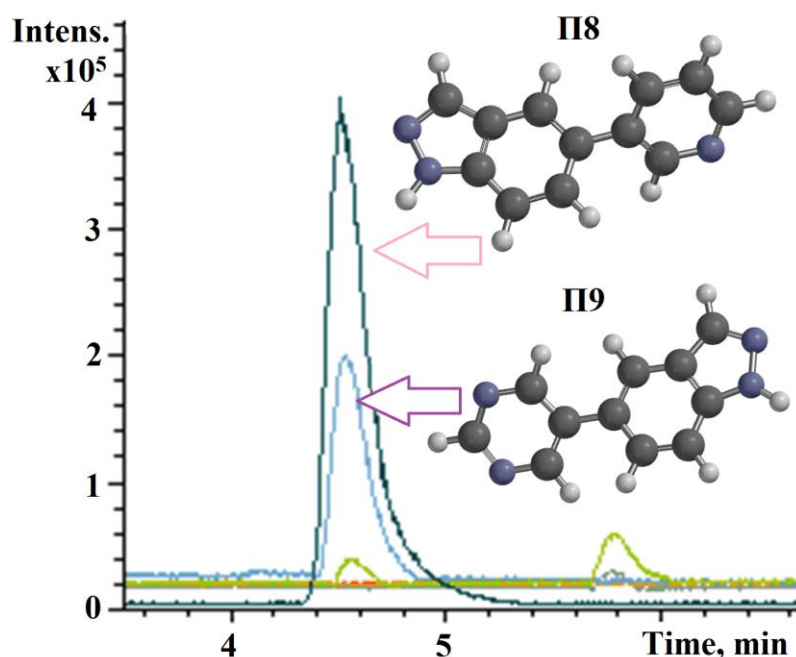


Рис. 3.3 Хроматограмма элюирования 5-(пиридин-3-ил)-1Н-индазола (**П8**) и 5-(пиримидин-5-ил)-1Н-индазола (**П9**) на ПГУ (элюент: ацетонитрил – вода 50/50 % (об.), объёмная скорость потока $F = 250$ мкл/мин, $T_c = 40^\circ\text{C}$)

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 урацила

В основе возможности установления корреляционных зависимостей между хроматографическими параметрами удерживания и физико-химическими характеристиками органических соединений (сорбатов) лежит строгая математическая связь между различными молекулярными дескрипторами [30]. Химическая теория графов позволяет переводить

различные молекулярные параметры соединений в структурные дескрипторы, записанные в виде численных индексов. Данная теория предполагает моделирование структуры молекулы в виде графов, где атомы являются вершинами, а химические связи – рёбрами. Такое представление помогает точнее установить корреляцию топологических индексов (числовых характеристик молекулы) с различными химическими, физическими или биологическими свойствами соединений.

К числу топологических индексов, зависящих от связей и распределения атомов в молекуле, которые могут быть полезны при описании структур, близких к анализируемым производным урацила, можно отнести индексы Загреба и Балабана. Индекс Загреба связан с числом и типом химических связей в молекуле, а также он учитывает электронное сопряжение в системе, что позволяет получить представление о структурной гибкости и стабильности молекул. Индекс Балабана необходим для характеристики топологического расстояния и компактности молекул, помогая дифференцировать пространственные изомеры. Стереохимические индексы, учитывая трёхмерную структуру молекулы, например, дескриптор плоской формы (*PBF*), характеризуют пространственное расположение молекулярных фрагментов. Электронные и зарядовые дескрипторы важны при учёте адсорбционных взаимодействий с сорбентом, поскольку поверхность пористого графитированного углерода поляризуема и способна к донорно-акцепторным взаимодействиям с молекулами гетероциклов. Гибридный индекс электротопологического состояния атомов, описывающий локальную полярность сорбата и его способность к индуцированным взаимодействиям с сорбентом (*VSA_EState1*), является эффективным при сопоставлении электротопологических состояний с площадью поверхности молекулы. Индекс «1» указывает на области с высокой электроноакцепторной способностью, т.е. на полярные группы. Также для характеристики полярных молекул используется трёхмерный дескриптор, описывающий структуру, – топологическая полярная площадь

поверхности (TPSA). Все вышеуказанные дескрипторы имеют связь с физико-химическими параметрами соединений и были использованы для построения корреляционных уравнений с логарифмом фактора удерживания.

Изучение зависимостей логарифма фактора удерживания от каждого отдельного молекулярного параметра, приведённого в таблице 2, показало слабую корреляцию (коэффициенты детерминации R^2 не превышали 0.4), поэтому методом регрессионного анализа получены уравнения зависимости от нескольких различных параметров (таблица 3).

Таблица 3. Некоторые корреляционные уравнения, полученные на основании регрессионного анализа зависимости удерживания от физико-химических и структурных параметров производных урацила.

№	Группа веществ	Уравнение множественной линейной регрессии	R	R^2
1'	1-6	$lg\ k = 1.702 \times PBF + 0.020 \times TPSA - 0.061 \times VSA_EState1 - 3.808$	0.98	0.95
2'		$lg\ k = 0.948 \times PBF + 0.017 \times TPSA + 0.005 \times V - 4.481$	0.96	0.92
3'		$lg\ k = 0.965 \times PBF + 0.015 \times TPSA + 0.005 \times S - 4.237$	0.95	0.90
4'	7-12	$lg\ k = 0.022 \times Zag1 + 0.074 \times V - 0.075 \times S - 0.812$	0.89	0.78
5'		$lg\ k = 0.028 \times Zag1 + 0.131 \times \mu - 0.381 \times \log P - 2.862$	0.88	0.77
6'		$lg\ k = 0.003 \times \alpha - 0.204 \times \log P + 0.107 \times VSA_EState1 + 0.965$	0.82	0.68
7'	1-12	$lg\ k = -0.091 \times PBF + 0.001 \times TPSA + 0.018 \times VSA_EStat1 + 0.792 \times J + 0.001 \times \mu + 0.034 \times \log P + 0.026 \times \alpha - 0.002 \times V + 0.002 \times Zag1 - 0.382$	0.999	0.998
8'		$lg\ k = -0.082 \times PBF + 0.001 \times TPSA + 0.018 \times VSA_EStat + 0.795 \times J + 0.035 \times \log P + 0.027 \times \alpha - 0.002 \times V + 0.002 \times Zag1 - 0.410$	0.999	0.998
9'		$lg\ k = 0.001 \times TPSA + 0.017 \times VSA_EStat + 0.869 \times J + 0.038 \times \log P + 0.035 \times \alpha - 0.003 \times V + 0.001 \times Zag1 - 0.922$	0.995	0.991

Примечание: коэффициенты множественной регрессии R и детерминации R^2 .

При разбиении анализируемых соединений на две группы, отличающиеся числом гидроксциклопентеновых заместителей, установлены следующие закономерности. Во-первых, исследование

сорбционных характеристик гетероциклов показало, что общий порядок элюирования производных, отличающихся по структуре заместителя в 5 положении гетероциклического основания, не зависит от числа гидроксиклопентеновых фрагментов (рис. 1). При этом значения фактора удерживания для всех молекул с одним гидроксиклопентеновым фрагментом (соединения **У3** – **У6**) оказываются меньше их аналогов с двумя (**У7** – **У10**) такими заместителями (табл. 2).

Для первой группы соединений (**У1** – **У6**, табл. 1), содержащих один гидроксиклопентеновый или линейный 2-гидроксиэтоксиметильный фрагмент, регрессионный анализ показал, что данные о полярной площади поверхности молекул (*TPSA*), дескрипторе плоской формы (*PBF*) и индексе электротопологического состояния атомов (*VSA_EState1*) являются наиболее подходящими для учёта их совместного влияния на адсорбцию ($R^2 = 0.95$). Также высокие значения коэффициента детерминации были получены и для других уравнений, учитывающих трёхмерную структуру молекул путём использования объёма или общей площади поверхности молекул (табл. 3). Стоит отметить, что корреляция между перечисленными параметрами для второй группы соединений (**У7** – **У12**) не показала аналогичных результатов: значения коэффициентов детерминации и множественной регрессии были существенно ниже и варьировались в пределах значений от 0,4 до 0,8.

Анализ регрессионных зависимостей второй группы (табл. 1) показал, что для неё наибольший вклад в корреляцию с логарифмом фактора удерживания вносят значения индексов Загреба, объёма и площади поверхности молекул ($R^2 = 0.78$). Аналогичные результаты получены и для уравнений, связывающих индекс Загреба с липофильностью и дипольным моментом ($R^2 = 0.77$), а вот учёт электротопологической структуры оказывает уже меньшее влияние на сорбцию ($R^2 = 0.68$ для уравнения, связывающего поляризуемость, дипольный момент и *VSA_EState1*). Полученные результаты свидетельствуют о значительном вкладе в

удерживание пространственного расположения структурных фрагментов, которые в силу своей геометрии могут оказывать стерические препятствия к адсорбции.

Однако полученные уравнения нельзя использовать для прогнозирования удерживания структурно близких производных урацила, поскольку по результатам дисперсионного анализа значимость приведённых в таблице 3 моделей мала: статистическая значимость для F -критерия, характеризующего модель, $F\text{-val} > 0.05$, для каждого отдельного параметра в модели $p\text{-val}$ также больше 0.05 (табл. 5) [31]. Следовательно, получение более точной модели линейной регрессии возможно с учётом большего числа параметров с обязательной оценкой вклада каждого молекулярного дескриптора в связь с фактором удерживания.

По результатам анализа многофакторной линейной регрессии для всех исследуемых производных урацила (1 – 12, табл. 1) получены три уравнения, содержащие различное число наиболее статистически значимых молекулярных дескрипторов (табл. 3).

Высокие значения коэффициентов множественной регрессии и детерминации свидетельствуют о хорошей линейности связи фактора удерживания и молекулярных дескрипторов. То, что полученные корреляции не являются ошибками вычислений, возникающими вследствие избыточного числа параметров, подтверждают результаты значимости критерия F ($F\text{-val} < 0.05$), а также $p\text{-val}$ коэффициентов, умножаемых на соответствующие молекулярные дескрипторы (< 0.05). Указанные статистические параметры представлены в таблице 4.

Анализ $p\text{-val}$ коэффициентов при дипольном моменте молекулы, несколько превышает 0.05, что свидетельствует о меньшем вкладе в модель данного параметра. Это может объясняться тем, что указанные гетероциклы способны к изменению пространственной структуры из-за вращения циклических заместителей вокруг C–C и C–N связей и кето-енольной таутомерии, вследствие чего численные значения дипольных моментов

молекул могут несколько изменяться в реальной системе. Таким образом, теоретически рассчитанные дипольные моменты молекул для описываемых структур являются усреднённой величиной и будут слабо коррелировать с экспериментальными характеристиками удерживания, поэтому этот параметр можно исключить из модели (8', табл. 3).

Выводы по разделу 3.2

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 веществами. Устранение подобных недостатков достигается с помощью высокоточных масс-спектрометрических приборов, осуществляющих регистрацию сигнала на основании данных о молекулярной массе соединения.

Ионизация в режиме электрораспыления (ЭРИ) 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 заряженных форм молекулярных 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 ЭРИ.

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 газо-хромато-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-ЭРИ-МС 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 3.4.

Таблица 3.4. Характеристика флексимерных производных пиридина и пиримидина методом ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС (содержание ацетонитрила и воды 50/50 % (об.), сорбент – ПГУ, $T_C = 313$ К)

№	Протонированный молекулярный ион			Протонированные фрагментные ионы		
	Брутто-формула	m/z, Да	I, %	Брутто-формула	m/z, Да	I, %
П1	$C_8H_9N_4^+$	161.08	51	$C_8H_6N_3^+$	144.06	26
				$C_7H_8N_3^+$	134.07	28
				$C_7H_5N_2^+$	117.04	100
				$C_6H_7N_2^+$	107.06	26
				$C_6H_4N^+$	90.05	39
				$C_5H_6N^+$	80.05	92
				$C_5H_3^+$	63.02	30
				$C_4H_5^+$	53.04	19
П2	$C_8H_8N_3O^+$	162.07	10	$C_7H_8N_3^+$	134.07	9
				$C_7H_5N_2^+$	117.04	4
				$C_6H_7N_2^+$	107.06	29
				$C_6H_6N^+$	92.05	3
				$C_5H_6N^+$	80.05	100
				$C_5H_3^+$	63.02	2
				$C_4H_5^+$	53.04	15
П3	$C_{11}H_{15}N_4O_2^+$	235.12	4	$C_8H_{17}N_2O_2^+$	173.08	15
				$C_8H_9N_4^+$	161.08	100
				$C_8H_6N_3^+$	144.06	68
				$C_7H_8N_3^+$	134.07	6
				$C_7H_5N_2^+$	117.04	28
				$C_6H_7N_2^+$	107.06	9
				$C_6H_4N^+$	90.05	21
				$C_6H_5^+$	77.04	2
П4	$C_{10}H_{14}N_5O_2^+$	236.12	7	$C_5H_3^+$	63.02	6
				$C_8H_8N_5^+$	174.08	6
				$C_7H_8N_5^+$	162.08	100
				$C_7H_5N_4^+$	145.05	8
				$C_6H_5N_4^+$	133.06	16
				$C_6H_4N_3^+$	118.04	10
				$C_5H_6N_3^+$	108.06	7
				$C_5H_3N_2^+$	91.03	3
				$C_4H_4N_2^+$	80.05	8
П5	$C_{10}H_{12}N_4O_3^+$	236.12	4	$C_3N_2^+$	64.02	2
				$C_8H_6N_4O^+$	174.08	9
				$C_7H_6N_4O^+$	162.08	100
				$C_7H_5N_4^+$	145.05	3
				$C_6H_5N_4^+$	133.05	15

				$C_6H_4N_3^+$	118.04	4
				$C_5H_6N_3^+$	108.06	8
				$C_5H_4N_2^+$	92.06	1
				$C_4H_5N_2^+$	81.05	4
П6	$C_{12}H_{14}N_5O^+$	244.12	11	$C_7H_8N_5^+$	162.08	100
				$C_7H_5N_4^+$	145.05	6
				$C_6H_5N_4^+$	133.05	21
				$C_6H_4N_3^+$	118.04	10
				$C_5H_6N_3^+$	108.06	7
				$C_5H_3N_2^+$	91.03	3
				$C_4H_5N_2^+$	81.04	7
П7	$C_{13}H_{15}N_4O^+$	243.13	13	$C_8H_9N_4^+$	161.08	100
				$C_8H_6N_3^+$	144.06	2
				$C_8H_8N_2^+$	132.07	40
				$C_8H_8N^+$	118.04	8
				$C_7H_9N^+$	107.06	4
				$C_5H_3N^+$	77.04	4
П8	$C_{12}H_{10}N_3^+$	196.09	41	$C_{12}H_9N^+$	167.07	100
				$C_{11}H_7^+$	139.05	33
				$C_9H_7^+$	115.05	25
				$C_7H_5^+$	89.04	5
				$C_5H_5^+$	65.04	2
П9	$C_{11}H_9N_4^+$	197.08	51	$C_{11}H_9N_2^+$	169.08	41
				$C_{10}H_9N^+$	143.07	17
				$C_9H_7^+$	115.05	100
				$C_7H_5^+$	89.04	50
				$C_5H_5^+$	65.04	5
				$C_5H_3^+$	63.02	11

Примечание: I – интенсивность сигнала на масс-спектре, %

В масс-спектрах исследованных гетероциклов присутствуют пики протонированных форм молекулярных ионов, а для соединения **П5** – катион-радикал молекулярного иона 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 ионы, имеющие одинаковые молекулярные массы. На интенсивность фрагментных ионов, вероятно, влияет природа гетероатома, входящего в функциональную группу, поскольку различия в электроотрицательности определяют внутримолекулярный перенос зарядов.

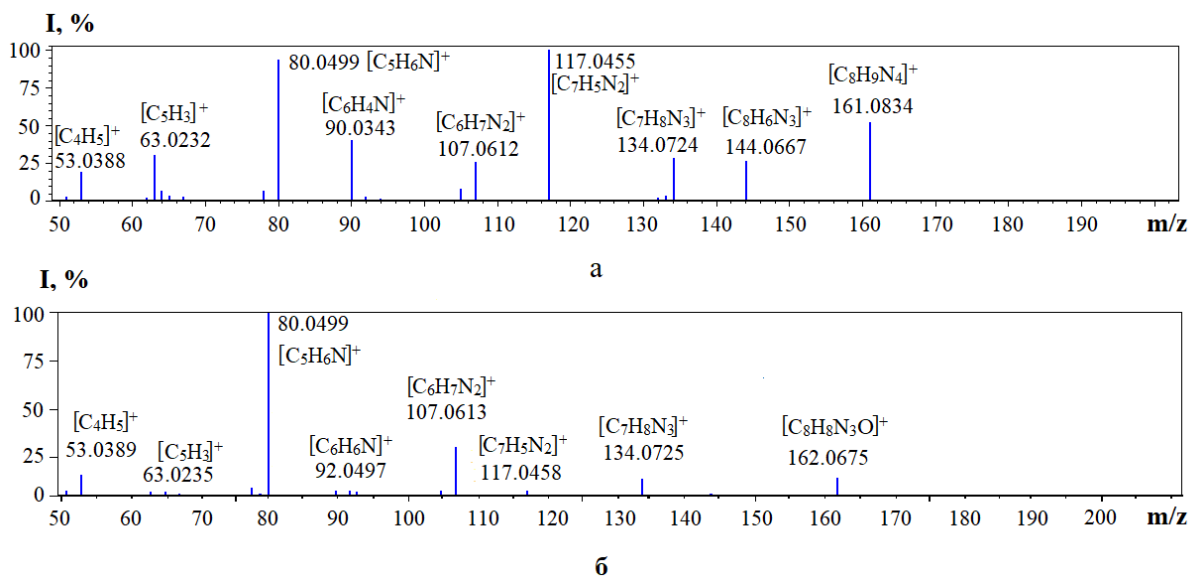


Рис. 3.4 Масс-спектр ионизации в режиме ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС и брутто-формулы фрагментных ионов флексимерных производных пиримидина с различными функциональными группами: а) 5-(1Н-пиррол-3-ил)пиримидин-4-амин (**П1**); б) 5-(1Н-пиррол-3-ил)пиримидин-4(3Н)-он (**П2**)

В условиях тандемной масс-спектрометрии фрагментные ионы образуются за счёт отщепления от исходного протонированного молекулярного иона нейтральных молекул. При этом возможны различные внутримолекулярные перегруппировки, вследствие чего в реальной системе высока вероятность существования фрагментных ионов с одинаковыми молекулярными массами (значениями m/z), но имеющих различное строение.

Если рассматривать процесс распада молекул гетероциклов с точки зрения поэтапного элиминирования молекул аммиака, циановодорода и воды...

Предполагаемые структурные формулы ионов, образуемых в процессе распада, и положения зарядов определялись на основании квантово-химических вычислений, в ходе которых определялись минимальные энтальпии образования ионов и рассчитывались значения сродства к протону (для структур, содержащих несколько гетероатомов).

В используемых условиях ионизации наиболее вероятно, что распад флексимерных гетероциклов начинается с раскрытия пиримидинового цикла, поскольку именно к нему присоединены функциональные группы.

Следующим этапом было изучение распада гетероциклов, содержащих несколько функциональных групп, одна из которых присоединяется к линейному или циклическому заместителю (ПЗ-П7). С применением метода теории функционала плотности также вычислены энергетические характеристики данных молекул и определены возможные направления распада. Так, например, для 2-((4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ола (П4) возможно протонирование амино- или гидроксильной группы в составе линейного заместителя. Полученные численные значения сродства к протону РА (табл. 3.4) указывают на то, что в случае присоединения катиона водорода к гидроксильной группе значения сродства к протону составляют 2061 кДж/моль, а при присоединении к аминогруппе – РА = 1982 кДж/моль. В первом случае энергия образования протонированного молекулярного иона выше, поэтому такая структура будет менее стабильна и, следовательно, более склонна к распаду (рис. 3.6). Различие между указанным энергетическим параметром менее 200 кДж/моль, следовательно, возможно одновременное существование обеих структур, что и отражено на масс-спектре (рис. 3.6) [161,162].

В таблице 3.4 приведены значения для наиболее вероятных протонированных структур, которые имеют минимальные значения теоретически вычисленных стандартных энтальпий образования, поскольку молекулы флексимерных гетероциклов содержат от трёх до шести атомов, способных являться акцепторами водородной связи. Выдвинутое предположение согласуется с экспериментальными данными, поскольку на всех спектрах ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС флексимерных производных, содержащих линейные или циклические заместители, присутствуют малоинтенсивные пики протонированных молекулярных ионов.

Максимальная интенсивность пиков на спектрах соответствует ионам с значениями m/z 161.08 и 162.08 Да, что соответствует гетероциклам, содержащим только функциональные группы при пиридиновом/пиримидиновом циклах. Из этого следует, что при протонировании гидроксильных групп в первую очередь происходит элиминирование линейных и циклических заместителей в виде молекул 2-метоксиэтанола (для соединений **П3-П5**) и цикlopент-2-ен-1-ола (для соединений **П6, П7**).

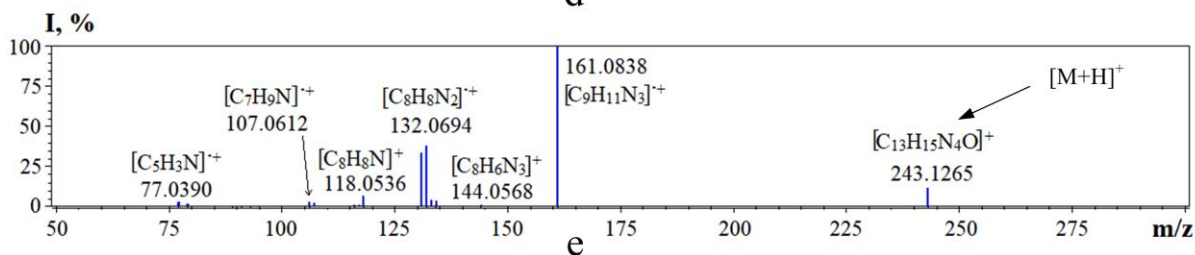
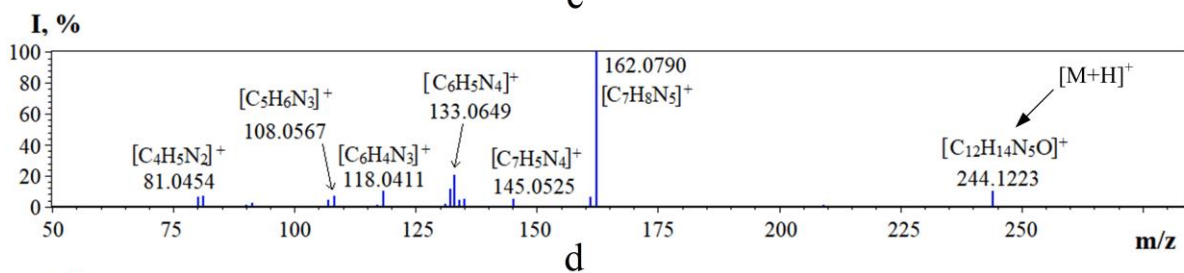
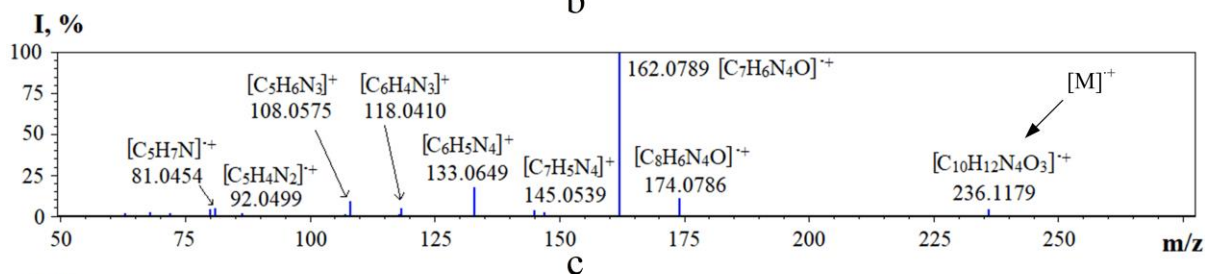
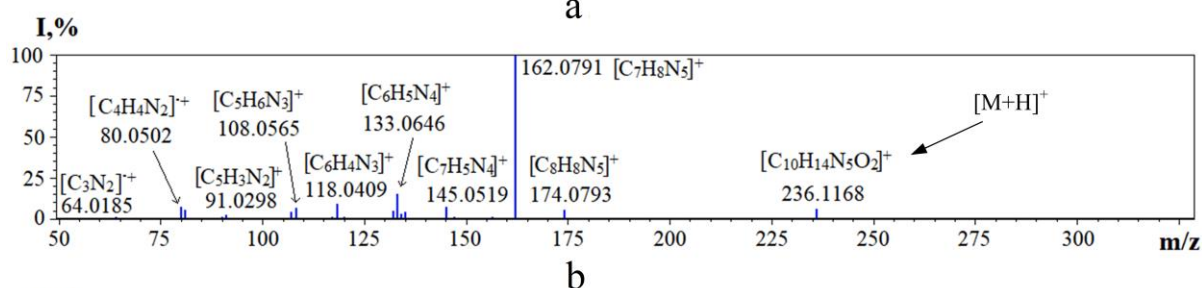
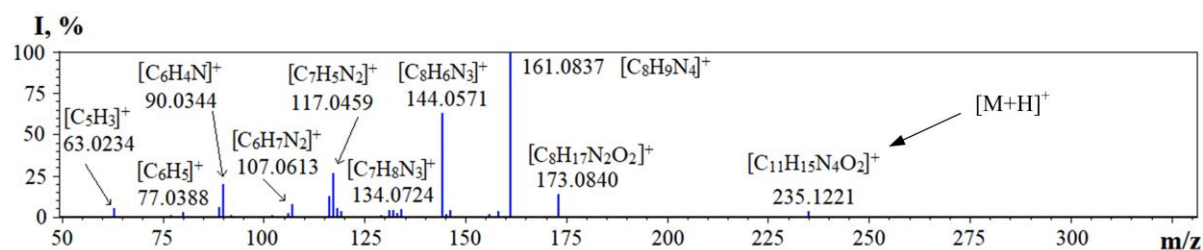


Рис. 3.6 Масс-спектры ионизации в режиме ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС и брутто-формулы фрагментных ионов флексимерных производных пиридина с линейными и циклическими заместителями: а) 2-((4-(2-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол (**ПЗ**); б) 2-((4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол (**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**).

Сравнение масс-спектров структурно близких флексимерных производных, содержащих линейный заместитель в пиразольном цикле и отличающихся числом атомов азота в шестичленном гетероцикле (**ПЗ** и **П4**), показало, что в обоих случаях на начальном этапе происходит элиминирование 2-метоксиэтанола (рис. 3.7). Последующая фрагментация протонированных катионов 3-(1Н-пиразол-4-ил)пиридин-2-амин (m/z 161.08 Да) и 5-(1Н-пиразол-4-ил)пиримидин-4-амин (m/z 162.08 Да) может протекать по двум параллельным направлениям. Последующий распад производных пиридина и пиримидина может протекать за счёт элиминирования молекулы аммиака с образованием иона с m/z 144.06 Да и 145.05 Да соответственно, или за счёт отщепления молекулы циановодорода или метиленамина с образованием ионов с m/z 134.07 и 133.06 Да, соответственно.

(рис. 4 из статьи)

Рис. 3.7 Схема образования фрагментных ионов производных пиразола с различным числом гетероатомов в шестичленном цикле в условиях ионизации электрораспылением в тандемном режиме ВЭЖХ: а) 2-((4-(2-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол (**ПЗ**); б) 2-((4-(4-аминопиримидин-5-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метокси)этан-1-ол (**П4**)

Экспериментально установлено, что для пиримидин-содержащего соединения **П4** наиболее вероятным является второй путь распада, поскольку относительные интенсивности пиков с m/z 133.05, 108.06 и 80.04 Да выше, чем у остальных. В случае производного пиридина **ПЗ**

относительная интенсивность пика с m/z 144.06 составила 68%, а последующая фрагментация, вероятно, протекает за счёт раскрытия пиразольного цикла с образованием ионов с m/z 117.05, 90.03 и 77.04 Да, поскольку их относительная интенсивность выше, чем для ионов, соответствующих другому пути распада.

3.3.3 Тандемная масс-спектрометрия и поиск характеристических ионов производных урацила

Выводы по разделу 3.3

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 электроспреем 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., Gonsalves R., Shenoy S. Studies on some N-bridged heterocycles derived from bis-[4-amino-5-mercapto-1, 2, 4-triazol-3-yl] alkanes // *Farm. Elsevier*, 1998. Т. 53, № 8–9. С. 574–578.
2. Prasad D.J. и др. Synthesis and antimicrobial activities of some new triazolothiadiazoles bearing 4-methylthiobenzyl moiety // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier*, 2009. Т. 44, № 2. С. 551–557.
3. Ashok M., Holla B.S. Convenient synthesis of some triazolothiadiazoles and triazolothiadiazines carrying 4-methylthiobenzyl moiety as possible antimicrobial agents // *J Pharmacol Toxicol*. 2007. Т. 2, № 3. С. 256–263.
4. Walczak K., Gondela A., Suwiński J. Synthesis and anti-tuberculosis activity of N-aryl-C-nitroazoles // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier*, 2004. Т. 39, № 10. С. 849–853.
5. Amir M., Shikha K. Synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation activities of some new 2-[(2, 6-dichloroanilino) phenyl] acetic acid derivatives // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier*, 2004. Т. 39, № 6. С. 535–545.
6. Almasirad A. и др. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 2, 4-triazoles // *Bioorganic \& Med. Chem. Lett. Elsevier*, 2004. Т. 14, № 24. С. 6057–6059.
7. Masuda K., Toga T., Hayashi N. Synthesis of 3-morpholino-N-ethoxycarbonyl sydnonimine-5-14C (sin-10-14C) // *J. Labelled Compd. Wiley Online Library*, 1975. Т. 11, № 2. С. 301–304.
8. Holla B.S. и др. New bis-aminomercaptotriazoles and bis-triazolothiadiazoles as possible anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier*, 2002. Т. 37, № 6. С. 511–517.
9. Holla B.S. и др. Synthesis characterization and anticancer activity studies on some Mannich bases derived from 1, 2, 4-triazoles // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier*, 2003. Т. 38, № 7–8. С. 759–767.

10. He Z.-X. и др. Discovery of 1, 2, 4-Triazole-3-thione derivatives as potent and selective DCN1 inhibitors for pathological cardiac fibrosis and remodeling // J. Med. Chem. ACS Publications, 2024. Т. 67, № 21. С. 18699–18723.
11. Kakefuda A. и др. 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 // J. Med. Chem. ACS Publications, 2002. Т. 45, № 12. С. 2589–2598.
12. Belenichev I. и др. The Influence of Basic Therapy and New Drugs on NO-Dependent Mechanisms of Cardiac Destruction in Chronic Heart Failure // Biomedicines. 2026. Т. 14, № 5. С. 1018.
13. Semenets A.P. и др. 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 // Eur. J. Med. Chem. Elsevier, 2022. Т. 244. С. 114823.
14. Sirakanyan S.N. и др. New triazole-based hybrids as neurotropic agents // RSC Adv. The Royal Society of Chemistry, 2024. Т. 14, № 45. С. 32922–32943.
15. Liao L. и др. Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-triazole derivatives as potential neuroprotectant against ischemic brain injury // Eur. J. Med. Chem. Elsevier, 2020. Т. 190. С. 112114.
16. Marzouk M.A. и др. Dual α -amylase and α -glucosidase inhibition by 1, 2, 4-triazole derivatives for diabetes treatment // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK London, 2025. Т. 15, № 1. С. 27172.
17. Джилкрист Т. Химия гетероциклических соединений. Мир, 1996.
18. Jagasia R. и др. Peptide cyclization and cyclodimerization by CuI-mediated azide-alkyne cycloaddition // J. Org. Chem. 2009. Т. 74, № 8. С. 2964.
19. Huber D., Hübner H., Gmeiner P. 1, 1'-Disubstituted ferrocenes as molecular hinges in mono- and bivalent dopamine receptor ligands // J. Med. Chem. ACS Publications, 2009. Т. 52, № 21. С. 6860–6870.

20. Leaver D.J. Synthesis and biological activity of sterol 14 α -demethylase and sterol C24-methyltransferase inhibitors // *Molecules*. MDPI, 2018. T. 23, № 7. C. 1753.
21. Daneshmend T.K., Warnock D.W. Clinical pharmacokinetics of ketoconazole // *Clin. Pharmacokinet.* Springer, 1988. T. 14, № 1. C. 13–34.
22. Richardson K. и др. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent // *Rev. Infect. Dis.* The University of Chicago Press, 1990. T. 12, № Supplement_3. C. S267--S271.
23. Myers R.S. Immunizing and Antimicrobial Agents, Chapter VI: Antifungal agents // Univ. Washington, MEDCH-401. 2006.
24. Debruyne D., Ryckelynck J.-P. Clinical pharmacokinetics of fluconazole // *Clin. Pharmacokinet.* Springer, 1993. T. 24, № 1. C. 10–27.
25. Dupont M.D.B. Itraconazole therapy in aspergillosis: study in 49 patients // *J. Am. Acad. Dermatol.* Elsevier, 1990. T. 23, № 3. C. 607–614.
26. Lestner J., Hope W.W. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections // *Expert Opin. drug Metab. \& Toxicol.* Taylor \& Francis, 2013. T. 9, № 7. C. 911–926.
27. Sanati H. и др. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. T. 41, № 11. C. 2492–2496.
28. Kobayashi K. и др. Breakthrough zygomycosis during voriconazole treatment for invasive aspergillosis // *Haematologica*. 2004. T. 89, № 11. C. ECR42--ECR42.
29. Vigouroux S. и др. Zygomycosis after prolonged use of voriconazole in immunocompromised patients with hematologic disease: attention required // *Clin. Infect. Dis.* The University of Chicago Press, 2005. T. 40, № 4. C. e35--e37.
30. Ritz N. и др. Failure of voriconazole to cure disseminated zygomycosis in an immunocompromised child // *Eur. J. Pediatr.* Springer, 2005. T. 164, №

4. C. 231–235.
31. Diekema D.J. и др. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi // J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology, 2003. T. 41, № 8. C. 3623–3626.
32. Roffey S.J. и др. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human // Drug Metab. Dispos. Elsevier, 2003. T. 31, № 6. C. 731–741.
33. Scott L.J., Simpson D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections // Drugs. Springer, 2007. T. 67, № 2. C. 269–298.
34. Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management // Lancet Infect. Dis. Elsevier, 2017. T. 17, № 12. C. e383–e392.
35. Seyedmousavi S. и др. Antifungal use in veterinary practice and emergence of resistance // Emerging and epizootic fungal infections in animals. Springer, 2018. C. 359–402.
36. Klix M.B., Verreet J.-A., Beyer M. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development // Crop Prot. Elsevier, 2007. T. 26, № 4. C. 683–690.
37. Dong F. и др. Chiral triazole fungicide difenoconazole: absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil // Environ. Sci. & Technol. ACS Publications, 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 // Chemosphere. Elsevier, 2024. T. 368. C. 143751.
39. Dong B. A comprehensive review on toxicological mechanisms and transformation products of tebuconazole: Insights on pesticide management

- // Sci. Total Environ. Elsevier, 2024. T. 908. C. 168264.
40. Teng M. и др. Effect of propiconazole on the lipid metabolism of zebrafish embryos (*Danio rerio*) // J. Agric. Food Chem. ACS Publications, 2019. T. 67, № 16. C. 4623–4631.
 41. Gopinath K., Radhakrishnan N. V, Jayaraj J. Effect of propiconazole and difenoconazole on the control of anthracnose of chilli fruits caused by *Colletotrichum capsici* // Crop Prot. Elsevier, 2006. T. 25, № 9. C. 1024–1031.
 42. He Z. и др. In silico, in vitro, and in vivo studies indicate the endocrine-disrupting effects of cyproconazole stereoisomers // J. Agric. Food Chem. ACS Publications, 2024. T. 72, № 44. C. 24228–24236.
 43. Cao F. и др. Developmental toxicity of the triazole fungicide cyproconazole in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*) // Environ. Sci. Pollut. Res. Springer, 2019. T. 26, № 5. C. 4913–4923.
 44. Bushuieva I. V и др. Influence of the carrier type and surfactants on the trifuzole emission from veterinary intrauterine suppositorie. 2020.
 45. Wang A. и др. Azocyclotin binds CDK4 to disrupt DNA methylation in Zebrafish epigenetic transgenerational inheritance // Environ. Sci. \& Technol. ACS Publications, 2025. T. 59, № 50. C. 27130–27142.
 46. Subbaraman R., Ghassemi H., Zawodzinski T.A. 4, 5-dicyano-1 H-[1, 2, 3]-triazole as a proton transport facilitator for polymer electrolyte membrane fuel cells // J. Am. Chem. Soc. ACS Publications, 2007. T. 129, № 8. C. 2238–2239.
 47. Subbaraman R., Ghassemi H., Zawodzinski Jr T. Triazole and triazole derivatives as proton transport facilitators in polymer electrolyte membrane fuel cells // Solid State Ionics. Elsevier, 2009. T. 180, № 20–22. C. 1143–1150.
 48. Fumagalli M. и др. Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases // Front. Pharmacol. Frontiers Media SA, 2017. T.

8. C. 941.
49. Micheli V. и др. Neurological disorders of purine and pyrimidine metabolism // *Curr. Top. Med. Chem.* Bentham Science Publishers, 2011. Т. 11, № 8. С. 923–947.
50. Tsismetzis N. и др. Nucleobase and nucleoside analogues: resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism // *Cancers (Basel)*. MDPI, 2018. Т. 10, № 7. С. 240.
51. Thomson J.M., Lamont I.L. Nucleoside analogues as antibacterial agents // *Front. Microbiol.* Frontiers Media SA, 2019. Т. 10. С. 952.
52. Shi H. и др. Comparing 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 // *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2017. Т. 23. С. 5230.
53. Fitzmaurice C., of Disease Cancer Collaboration G.B. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 2006 to 2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. American Society of Clinical Oncology, 2018.
54. Sung H. и др. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA. Cancer J. Clin.* Wiley Online Library, 2021. Т. 71, № 3. С. 209–249.
55. Lucas L.K., Lipman A.G. Recent advances in pharmacotherapy for cancer pain management // *Cancer Pract.* Wiley Online Library, 2002. Т. 10. С. s14--s20.
56. Emami L. и др. Synthesis, design, biological evaluation, and computational analysis of some novel uracil-azole derivatives as cytotoxic agents // *BMC Chem.* Springer, 2024. Т. 18, № 1. С. 3.
57. Rose M.G., Farrell M.P., Schmitz J.C. Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy // *Clin. Colorectal Cancer.* Elsevier, 2002. Т. 1, № 4. С. 220–229.

58. Hoff P.M., Pazdur R. UFT plus oral leucovorin: a new oral treatment for colorectal cancer // *Oncologist*. Oxford University Press, 1998. Т. 3, № 3. С. 155–164.
59. Paschall A. V и др. H3K9 trimethylation silences Fas expression to confer colon carcinoma immune escape and 5-fluorouracil chemoresistance // *J. Immunol*. Oxford University Press, 2015. Т. 195, № 4. С. 1868–1882.
60. Lone M.N. и др. Synthesis and biological evaluation of novel uracil derivatives as thymidylate synthase inhibitors // *Appl. Biochem. Biotechnol*. Springer, 2023. Т. 195, № 10. С. 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 // *Invest. New Drugs*. Springer, 2000. Т. 18, № 4. С. 331–342.
62. Libra M. и др. Thymidylate synthetase mRNA levels are increased in liver metastases of colorectal cancer patients resistant to fluoropyrimidine-based chemotherapy // *BMC Cancer*. Springer, 2004. Т. 4, № 1. С. 11.
63. Beumer J.H. и др. Pharmacokinetics, metabolism, and oral bioavailability of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine in mice // *Clin. cancer Res*. American Association for Cancer Research, 2006. Т. 12, № 24. С. 7483–7491.
64. Segura M. и др. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? // *Trends Microbiol*. Elsevier, 2017. Т. 25, № 7. С. 585–599.
65. Vötsch D. и др. *Streptococcus suis*--the “two faces” of a pathobiont in the porcine respiratory tract // *Front. Microbiol*. Frontiers Media SA, 2018. Т. 9. С. 480.
66. Uruén C. и др. How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments // *Vet. Res*. Springer, 2022. Т. 53, № 1. С. 91.
67. Li J. и др. Evaluating the antibacterial and antivirulence activities of floxuridine against *Streptococcus suis* // *Int. J. Mol. Sci*. MDPI, 2023. Т. 24, № 18. С. 14211.

68. Li J.J., Mitchell L.H., Dow R.L. Thyroid receptor agonists for the treatment of androgenetic alopecia // *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* Elsevier, 2010. T. 20, № 1. С. 306–308.
69. Babkov D.A. и др. 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 // *Bioorganic & Med. Chem.* Elsevier, 2015. T. 23, № 21. С. 7035–7044.
70. Wen Z. и др. Antiviral and Cytostatic Evaluation of 5-(1-Halo-2-sulfonylvinyl)-and 5-(2-Furyl) uracil Nucleosides // *Arch. Pharm. (Weinheim).* Wiley Online Library, 2017. T. 350, № 3–4. С. 1700023.
71. Jain K., Sharma S., Utreja D. Uracil: A Pharmacophore with Diverse Biological Potential // *ChemistrySelect.* Wiley Online Library, 2024. T. 9, № 5. С. e202303179.
72. Tanaka H. и др. 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) // *J. Med. Chem.* ACS Publications, 1991. T. 34, № 1. С. 349–357.
73. Novikov M.S. и др. Synthesis and anti-HCMV activity of 1-[(phenoxy) alkyl] uracil derivatives and analogues thereof // *Bioorganic & Med. Chem.* Elsevier, 2013. T. 21, № 14. С. 4151–4157.
74. Poorvashree J., Suneela D. Novel drug delivery of dual acting prodrugs of hydroxychloroquine with aryl acetic acid NSAIDs: Design, kinetics and pharmacological study // *Drug Deliv. Transl. Res.* Springer, 2017. T. 7, № 5. С. 709–730.
75. Khandazhinskaya A.L. и др. Dual-targeted anti-CMV/anti-HIV-1 heterodimers // *Biochimie.* Elsevier, 2021. T. 189. С. 169–180.
76. Chakraborty G. и др. Nickel catalyzed sustainable synthesis of benzazoles and purines via acceptorless dehydrogenative coupling and borrowing hydrogen approach // *Org. & Biomol. Chem.* The Royal Society of Chemistry, 2021. T. 19, № 33. С. 7217–7233.

77. Doganc F. и др. Regioselective N-alkylation of some 2 or 6-chlorinated purine analogues // J. Mol. Struct. Elsevier, 2023. Т. 1272. С. 134200.
78. Valiaeva N. и др. Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of acyclic purine and pyrimidine nucleoside phosphonates against HIV-1 in vitro // Antiviral Res. Elsevier, 2006. Т. 72, № 1. С. 10–19.
79. Ashry E.S.H. El и др. Synthesis of 2-bromomethyl-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-propyl pyrimidine and theophylline nucleosides under microwave irradiation. Evaluation of their activity against hepatitis B virus // Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. Taylor \& Francis, 2006. Т. 25, № 8. С. 925–939.
80. Kascatan-Nebioglu A. и др. Synthesis from caffeine of a mixed N-heterocyclic carbene- silver acetate complex active against resistant respiratory pathogens // J. Med. Chem. ACS Publications, 2006. Т. 49, № 23. С. 6811–6818.
81. Maddheshiya A.K. и др. Synergistic activity of noble trimetallic nanofluids: unveiling unprecedented antimicrobial potential and computational insights // ACS Appl. Bio Mater. ACS Publications, 2024. Т. 7, № 9. С. 5906–5924.
82. Salas-Ambrosio P. и др. Caffeine and cationic copolymers with antimicrobial properties // ACS bio \& med Chem Au. ACS Publications, 2023. Т. 3, № 2. С. 189–200.
83. Chaurasiya A. и др. An insight into the rational design of recent purine-based scaffolds in targeting various cancer pathways // J. Mol. Struct. Elsevier, 2023. Т. 1274. С. 134308.
84. Guo Y. и др. Design, synthesis and biological evaluation of purine-based derivatives as novel JAK2/BRD4 (BD2) dual target inhibitors // Bioorg. Chem. Elsevier, 2023. Т. 132. С. 106386.
85. Mohamed A.R. и др. 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 // Bioorg. Chem. Elsevier, 2021. Т. 107. С. 104569.

86. Schino I. и др. Exploring mannosylpurines as copper chelators and cholinesterase inhibitors with potential for Alzheimer's disease // *Pharmaceuticals*. MDPI, 2022. Т. 16, № 1. С. 54.
87. Bennett L.L. и др. Purine nucleoside phosphorylase inhibitors: biochemical and pharmacological studies with 9-benzyl-9-deazaguanine and related compounds. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Elsevier, 1993. Т. 266, № 2. С. 707–714.
88. Evans G.B. и др. Exploring structure- activity relationships of transition state analogues of human purine nucleoside phosphorylase // *J. Med. Chem.* ACS Publications, 2003. Т. 46, № 15. С. 3412–3423.
89. Smyth W.F. Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis // *Electrophoresis*. Wiley Online Library, 2005. Т. 26, № 7–8. С. 1334–1357.
90. Sharma M., Prasher P. An epigrammatic status of the 'azole'-based antimalarial drugs // *RSC Med. Chem.* The Royal Society of Chemistry, 2020. Т. 11, № 2. С. 184–211.
91. Özdemir M. и др. 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 // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2015. Т. 137. С. 1304–1314.
92. Musil Z. и др. Synthesis, Separation and UV/Vis Spectroscopy of Pyrazino-quinoxalino-porphyrazine Macrocycles. Wiley Online Library, 2007.
93. Keil D. и др. Preparation and UV/Vis Spectroscopic Characterization of N, N-Disubstituted 2-Amino-5-arylazoselenazoles and Some of Their Carbocyclic and Heterocyclic Analogues // *J. für Prakt. Chemie.* Wiley Online Library, 2000. Т. 342, № 2. С. 169–174.
94. Dürüst Y., Yıldırım M. Synthesis, UV-Vis spectra, and Hammett correlation of some novel bis (dihydropyrrolo [3, 4-c] pyrazoles) // *Monatshefte für Chemie-Chemical Mon.* Springer, 2010. Т. 141, № 9. С.

- 961–973.
95. Mathew V., Keshavayya J., Vaidya V.P. Heterocyclic system containing bridgehead nitrogen atom: synthesis and pharmacological activities of some substituted 1, 2, 4-triazolo [3, 4-b]-1, 3, 4-thiadiazoles // *Eur. J. Med. Chem.* Elsevier, 2006. T. 41, № 9. C. 1048–1058.
 96. Dwivedi A.R. и др. A decade of pyridine-containing heterocycles in US FDA approved drugs: a medicinal chemistry-based analysis // *RSC Med. Chem.* The Royal Society of Chemistry, 2025. T. 16, № 1. C. 12–36.
 97. Shin J.H. и др. Quantitative analysis of heterocyclic amines in urine by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.* Elsevier, 2014. T. 447. C. 169–176.
 98. Keim H. и др. Method for determining nitrogenous heterocycle compounds in wine // *J. Agric. Food Chem.* ACS Publications, 2002. T. 50, № 21. C. 5803–5807.
 99. Rohloff J. Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling // *Molecules.* MDPI, 2015. T. 20, № 2. C. 3431–3462.
 100. Szappanos Á. и др. Synthesis and HPLC-ECD Study of Cytostatic Condensed O, N-Heterocycles Obtained from 3-Aminoflavanones // *Biomolecules.* MDPI, 2020. T. 10, № 10. C. 1462.
 101. Abdighahroudi M.S., Lutze H. V, Schmidt T.C. Development of an LC-MS method for determination of nitrogen-containing heterocycles using mixed-mode liquid chromatography: Abdighahroudi MS et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer, 2020. T. 412, № 20. C. 4921–4930.
 102. Sentellas S. и др. Determination of heterocyclic aromatic amines by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry using in-line preconcentration // *Electrophoresis.* Wiley Online Library, 2003. T. 24, № 17. C. 3075–3082.
 103. Huck C.W. и др. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for forensic analysis // *Open Chem. Eng. J.* 2007. T. 1, № 1.

104. Rosales-Conrado N. и др. 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 // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer, 2008. Т. 391, № 4. С. 1433–1442.
105. Švábenský R., Kočí K., Šimek Z. The study of properties of HPLC determination of polycyclic aromatic nitrogen heterocycles // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* Taylor & Francis, 2007. Т. 87, № 5. С. 337–349.
106. Wu S. и др. Development and validation of a multianalyte method for quantification of isoxazolines in animal-derived matrix samples using SPE-HPLC--MS/MS // *J. Food Compos. Anal.* Elsevier, 2023. Т. 123. С. 105620.
107. Yarovaya O.I. и др. Synthesis of N-heterocyclic amides based on (+)-camphoric acid and study of their antiviral activity and pharmacokinetics // *Russ. Chem. Bull.* Springer, 2023. Т. 72, № 3. С. 807–818.
108. Szultka-Mlynska M., Buszewski B. Electrochemical oxidation of selected immunosuppressants and identification of their oxidation products by means of liquid chromatography and tandem mass spectrometry (EC-HPLC-MS/MS) // *J. Pharm. Biomed. Anal.* Elsevier, 2019. Т. 176. С. 112799.
109. Qiu J. и др. Nontargeted Identification of an N-Heterocyclic Compound in Source Water and Wastewater as a Precursor of Multiple Nitrosamines // *Environ. Sci. & Technol.* ACS Publications, 2021. Т. 55, № 1. С. 385–392.
110. Jian S.-H. и др. Analysis of heterocyclic amines in meat products by liquid chromatography--Tandem mass spectrometry // *J. food drug Anal.* Elsevier, 2019. Т. 27, № 2. С. 595–602.
111. He J. и др. An HPLC--MS/MS method for the quantitative determination of 4-hydroxy-anethole trithione in human plasma and its application to a pharmacokinetic study // *J. Pharm. Biomed. Anal.* Elsevier, 2011. Т. 54, № 3. С. 551–556.
112. Üstün Z., Demiralay E.Ç. Determination of the dissociation constants of six pharmacologically active imidazole antifungal agents by RPLC method // *Microchem. J.* Elsevier, 2025. С. 116019.

113. Киселев А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. Высш. шк., 1986.
114. Слиякова И.Б., Денисова Т.И. Кремнийорганические адсорбенты: Получение, свойства, применение. Наукова думка, 1988.
115. 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.
116. Soukup J., Jandera P. Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography // J. Chromatogr. A. Elsevier, 2014. T. 1374. C. 102–111.
117. Lough W.J., Wainer I.W. High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. cRc press, 1995.
118. Лисичкин Г.В. и др. Химия привитых поверхностных соединений. 2003.
119. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюент в жидкостной хроматографии // Воронеж ВГУ. 2003.
120. Pinkerton T.C. Analysis of drugs in biological fluids by direct injection onto ISRP columns // Am. Clin. Lab. 1989. T. 8, № 4. C. 32–37.
121. Tsyurupa M.P. и др. Physicochemical and adsorption properties of hypercross-linked polystyrene with ultimate cross-linking density // J. Sep. Sci. Wiley Online Library, 2014. T. 37, № 7. C. 803–810.
122. Hanai T. Separation of polar compounds using carbon columns // J. Chromatogr. A. Elsevier, 2003. T. 989, № 2. C. 183–196.
123. Knox J.H., Kaur B., Millward G.R. Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography // J. Chromatogr. A. Elsevier, 1986. T. 352. C. 3–25.
124. Jenkins N., Black M., Schneider H.G. Simultaneous determination of voriconazole, posaconazole, itraconazole and hydroxy-itraconazole in human plasma using LCMS/MS // Clin. Biochem. Elsevier, 2018. T. 53. C.

- 110–115.
125. Wang Y. и др. Simultaneous determination of a four-triazole antifungal panel in human plasma by LC-MS/MS for clinical therapeutic drug monitoring // *Microchem. J. Elsevier*, 2026. С. 117877.
 126. Černá K., Kozl'ík P. Chromatographic method for rapid determination of triazoles in ribavirin intermediates synthesis: stationary phase comparison // *Monatshefte für Chemie-Chemical Mon. Springer*, 2024. Т. 155, № 8. С. 805–811.
 127. Grinevich O.I., Sholokhova A.Y., Matyushin D.D. Retention Behavior of Nitrogen-Containing Heterocyclic Compounds in Reversed-Phase and Hydrophilic HPLC--MS // *J. Anal. Chem. Springer*, 2025. Т. 80, № 5. С. 903–911.
 128. Liebler D.C., Zimmerman L.J. Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry // *Biochemistry. ACS Publications*, 2013. Т. 52, № 22. С. 3797–3806.
 129. Jain S.K. и др. An Optimized Method for LC--MS-Based Quantification of Endogenous Organic Acids: Metabolic Perturbations in Pancreatic Cancer // *Int. J. Mol. Sci. MDPI*, 2024. Т. 25, № 11. С. 5901.
 130. da Silva J.M. и др. Speciation of nitrogen-containing compounds in an unfractionated coal tar sample by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. A. Elsevier*, 2014. Т. 1373. С. 159–168.
 131. Kluska M. и др. Occurrence, Properties, Applications and Analytics of Cytosine and Its Derivatives // *Molecules. MDPI*, 2025. Т. 30, № 17. С. 3598.
 132. Olsen B.A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities // *J. Chromatogr. A. Elsevier*, 2001. Т. 913, № 1–2. С. 113–122.
 133. Liu H. и др. Comparison of three derivatization reagents for the simultaneous determination of highly hydrophilic pyrimidine antitumor

- agents in human plasma by LC--MS/MS // *J. Chromatogr. B. Elsevier*, 2012. T. 893. C. 49–56.
134. Pandey K., Dubey R.S., Prasad B.B. A critical review on clinical application of separation techniques for selective recognition of uracil and 5-fluorouracil // *Indian J. Clin. Biochem. Springer*, 2016. T. 31, № 1. C. 3–12.
 135. Pereira L. Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications // *J. Liq. Chromatogr. \& Relat. Technol. Taylor \& Francis*, 2008. T. 31, № 11–12. C. 1687–1731.
 136. Hahn R.Z. и др. 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 // *Clin. Biochem. Elsevier*, 2015. T. 48, № 13–14. C. 915–918.
 137. Bennani Y. и др. An optimized HPLC-MS/MS assay for uracil and dihydrouracil in plasma: Improving dihydropyrimidine dehydrogenase phenotyping for individualized fluoropyrimidine treatment // *J. Chromatogr. B. Elsevier*, 2026. C. 124926.
 138. McQuarrie D.A. *Quantum Chemistry University Science Books // Mill Val. CA*. 1983.
 139. Born M., Oppenheimer R. On the quantum theory of molecules // *Quantum Chemistry: Classic Scientific Papers. World Scientific*, 2000. C. 1–24.
 140. Boys S.F. Electronic wave functions. I. A general method of calculation for the stationary states of any molecular system // *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci. JSTOR*, 1950. C. 542–554.
 141. Kezin V.A. и др. New derivatives of 5-substituted uracils: potential agents with a wide spectrum of biological activity // *Molecules. MDPI*, 2022. T. 27, № 9. C. 2866.
 142. Khandazhinskaya A. и др. Novel fleximer pyrazole-containing adenosine analogues: Chemical, enzymatic and highly efficient biotechnological synthesis // *Org. \& Biomol. Chem. The Royal Society of Chemistry*, 2021.

- T. 19, № 34. С. 7379–7389.
143. Khandazhinskaya A. и др. Design and synthesis of new modified flexible purine bases as potential inhibitors of Human PNP // *Molecules*. MDPI, 2023. Т. 28, № 3. С. 928.
144. Hehre W.J. A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations. Wavefunction Irvine, CA, 2003. Т. 2.
145. Ugbe F.A. и др. Molecular docking-based virtual screening, molecular dynamic simulation, and 3-D QSAR modeling of some pyrazolopyrimidine analogs as potent anti-filarial agents // *Silico Pharmacol*. Springer, 2022. Т. 10, № 1. С. 21.
146. Fokoue H.H. и др. Fragmentation pattern of amides by EI and HRESI: study of protonation sites using DFT-3LYP data // *RSC Adv*. The Royal Society of Chemistry, 2018. Т. 8, № 38. С. 21407–21413.
147. Moriwaki H. и др. Mordred: a molecular descriptor calculator // *J. Cheminform*. Springer, 2018. Т. 10, № 1. С. 4.
148. Pracht P. и др. CREST—A program for the exploration of low-energy molecular chemical space // *J. Chem. Phys*. AIP Publishing, 2024. Т. 160, № 11.
149. Pracht P., Bohle F., Grimme S. Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods // *Phys. Chem. Chem. Phys*. The Royal Society of Chemistry, 2020. Т. 22, № 14. С. 7169–7192.
150. Bannwarth C. и др. Extended tight-binding quantum chemistry methods // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci*. Wiley Online Library, 2021. Т. 11, № 2. С. e1493.
151. Gritti F., Kazakevich Y., Guiochon G. Measurement of hold-up volumes in reverse-phase liquid chromatography: Definition and comparison between static and dynamic methods // *J. Chromatogr. A*. Elsevier, 2007. Т. 1161, № 1–2. С. 157–169.
152. Kaliszan R. и др. Mechanism of retention in high-performance liquid chromatography on porous graphitic carbon as revealed by principal

- component analysis of structural descriptors of solutes // *J. Chromatogr. A. Elsevier*, 1990. Т. 499. С. 333–344.
153. Авгуль Н.Н., Киселев А.В., Пошкус Д.П. Адсорбция газов и паров на однородных поверхностях. *Химия*, 1975.
154. Буряк А.К., Матюшин Д.Д. Моделирование адсорбции нежестких органических молекул на графитированной термической саже методом Монте-Карло для предсказания их характеристик удерживания // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017. Т. 17, № 2. С. 204–211.
155. Polunin K.E. и др. Interaction of S, N-derivatives of alkylhydrazines with carbon sorbents // *Colloid J. Springer*, 2019. Т. 81, № 4. С. 431–438.
156. Matyushin D.D., Ukleina A.N., Buryak A.K. A Comparative Study of Adsorption of Isomeric Molecules on Carbon Sorbents from a Gas and a Liquid // *Prot. Met. Phys. Chem. Surfaces. Springer*, 2020. Т. 56, № 1. С. 38–43.
157. Matyushin D.D., Buryak A.K. Simulation of the Adsorption of Polychlorinated Aromatic Hydrocarbons on Graphitized Thermal Carbon Black for Predicting Chromatographic Retention Values // *J. Anal. Chem. Springer*, 2019. Т. 74, № Suppl 1. С. 47–51.
158. Wang J. и др. Development and testing of a general amber force field // *J. Comput. Chem. Wiley Online Library*, 2004. Т. 25, № 9. С. 1157–1174.
159. Белякова Л.Д., Буряк А.К., Ларионов О.Г. Хроматография-метод исследования химии поверхности и процессов на межфазных границах // *Физикохимия поверхности и защита материалов. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук"*, 2013. Т. 49, № 6. С. 551.
160. Milyushkin A.L., Matyushin D.D., Buryak A.K. A peculiar chromatographic selectivity of porous graphitic carbon during the separation of dileucine isomers // *J. Chromatogr. A. Elsevier*, 2020. Т. 1613. С. 460724.

161. Cautereels J. и др. Quantum chemical mass spectrometry: ab initio prediction of electron ionization mass spectra and identification of new fragmentation pathways // J. Mass Spectrom. Wiley Online Library, 2016. Т. 51, № 8. С. 602–614.
162. Tai Y. и др. Fragmentation study of protonated chalcones by atmospheric pressure chemical ionization and tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. An Int. J. Devoted to Rapid Dissem. Up-to-the-Minute Res. Mass Spectrom. Wiley Online Library, 2006. Т. 20, № 6. С. 994–1000.