

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого

Президента России Б. Н. Ельцина»

Химико-технологический институт

Кафедра аналитической химии

На правах рукописи



Можаровская Полина Николаевна

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ
АНАЛОГОВ ТРИАЗАВИРИНА® - НИТРОТРИАЗОЛОТРИАЗИНОВ.
МЕТОДОЛОГИЯ КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВЕРОЯТНЫХ
МЕХАНИЗМОВ ИХ ЭЛЕКТРОПРЕВРАЩЕНИЙ

1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук, профессор
Козицина Алиса Николаевна

Екатеринбург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	19
1.1 Пути и механизмы электропревращения ароматических нитросоединений	21
1.1.1 Электрохимическое превращение нитросоединений в водной среде	21
1.1.2 Образование анион-радикалов в процессе электровосстановления нитросоединений в апротонной среде и их протонирование	24
1.1.3 Цифровые методы в исследовании механизмов превращений соединений.....	27
1.2 Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе	30
1.2.1 Вольтамперометрическое определение нитросодержащих лекарственных средств.....	33
1.2.2 Различия в методиках вольтамперометрического определения структурных аналогов.....	39
1.3 Постановка задачи исследования	41
ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА.....	43
2.1 Объекты исследования.....	43
2.2 Оборудования и средства измерения.....	44
2.3 Реактивы.....	45
2.4 Электрохимические исследования	46
2.5 Проведение препаративного электролиза.....	46
2.6 Регистрация ЭПР-спектров	47
2.7 Проведение квантово-химического моделирования.....	48
2.8 Изготовление толстопленочных углеродсодержащих электродов.....	48

ГЛАВА 3 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3-НИТРО-4-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА МОНОГИДРАТА.....	49
3.1 Электрохимическое поведение натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата.....	49
3.2 Сравнительная характеристика процессов электровосстановления натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата и натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата	56
3.3 Изучение продуктов электровосстановления натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата и натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата методом ЭПР-спектроскопии и квантово-химическими расчетами	57
Выводы к главе 3	66
ГЛАВА 4 МЕТОДИКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3-НИТРО-4-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНИДА МОНОГИДРАТА НА СТЕКЛОУГЛЕРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ	67
4.1 Выбор режима регистрации вольтамперограмм натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата в кислой среде.....	67
4.2 Характеристики градуировочного графика для определения соединения натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата на стеклоуглеродном электроде	70
4.3 Вольтамперометрическое определение натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата в нейтральной среде.....	72

Выводы к главе 4	75
ГЛАВА 5 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3-НИТРО-4-ОКСО-7-ЭТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА, НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3-НИТРО-4-ОКСО-7-ПРОПИЛЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА, НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3-НИТРО-4-ОКСО-7-БУТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА	76
5.1. Электрохимическое поведение натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата, натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропиллтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата, натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата и сравнение его с натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата.....	76
5.2 Изучение продуктов электровосстановления соединений натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата, натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата, натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропиллтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата, натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата методом ЭПР-спектроскопии и квантово-химическими расчетами.....	84
Выводы к главе 5	96
ГЛАВА 6 МЕТОДИКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3-НИТРО-4-ОКСО-7-ЭТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА	97
6.1 Выбор режима для регистрации вольтамперограмм натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата	97

6.2 Характеристики градуировочного графика для определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата на стеклоуглеродном электроде	100
6.3 Выбор материала для толсто пленочного углеродсодержащего электрода .	103
6.4 Характеристики градуировочного графика для определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата на толсто пленочном электрохимическом электроде.....	104
6.5 Сравнительная характеристика электродов для определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата .	107
Выводы к главе 6	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112
Приложение А (обязательное)	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Современные исследования демонстрируют, что доля оригинальных препаратов, зарегистрированных в мире, крайне мала и не превышает 5% от общего числа фармпродукции. При этом потребность в создании новых лекарственных средств неуклонно увеличивается в связи с непрекращающимся ростом заболеваний различной природы. Появление новых штаммов вирусов и развитие резистентности у уже известных вирусов к существующим ЛС делают необходимым создание оригинальных препаратов, обладающих большей биологической активностью и широким спектром действия.

Известно, что разработка нового ЛС является финансово затратным и длительным процессом, включающим в себя, помимо синтеза соединений и проведения комплекса физико-химических исследований по доказательству их структуры, этапы доклинических и клинических испытаний. Обладание информацией о предварительной оценке возможной биологической активности не только уже синтезированных, но и планируемых соединений, является значимым для более быстрого поиска потенциального ЛС. Сведения, полученные с использованием метода молекулярного докинга, набирающего популярность в сфере цифровых технологий, не всегда прогнозируемые. Поскольку одной из трудностей, возникающих при его проведении, является учет мультипараметричности рассматриваемых систем, например, взаимодействия интермедиатов вещества с сайтами связывания белка, а не его исходной молекулы.

Разработка подхода для комплексного изучения возможных превращений соединений с использованием современных инструментальных и цифровых методов, возможно, приблизит исследователей к пониманию связи между биологической активностью, физико-химическими свойствами вещества и структурой молекулы, что, в свою очередь, позволит химикам-синтетикам осуществлять направленный синтез соединений с ценными биологическими

свойствами. В настоящее время в литературе не предложено подобного способа комплексного исследования веществ. Поэтому предлагается при разработке ЛС использовать методологию, основанную на сочетании применения как инструментальных, так и расчетных методов (квантово-химических, молекулярного докинга, молекулярной динамики) для оперативного получения результатов, которые с большей степенью вероятности будут коррелировать с данными, полученными в ходе биологических испытаний.

Одними из методов, позволяющих приблизиться к пониманию механизма действия потенциального ЛС (основное вещество которого способно подвергаться редокс-превращениям), являются электрохимические методы исследования. Благодаря этому становится выполнимым приближенное моделирование некоторых биологических процессов, таких как «мягкое» окисление-восстановление молекул с образованием промежуточных продуктов радикальной природы, аналогично тому, как это происходит в организме человека. Кроме того, ЭХМИ в тандеме со спектроскопией электронного парамагнитного резонанса способствуют установлению наличия и структуры парамагнитных радикальных частиц. Препаративный электролиз совместно с высокоэффективной жидкостной хроматографией, масс-спектрометрией высокого разрешения позволяет получить и идентифицировать промежуточные и конечные продукты редокс-реакции.

В литературе остается малоосвещенным вопрос о конкретных этапах пути превращения веществ, при этом инструментальные методы дают основания к их идентификации. Однако в настоящее время и этого становится уже недостаточно для описания полных сложных метаболических последовательностей. В связи с этим для более детального и обширного понимания способов преобразования соединений используются квантово-химические расчеты, молекулярный докинг, метод классической молекулярной динамики. Предлагаемая сочетанная методология, включающая инструментальные и расчетные методы, позволит разносторонне исследовать превращения веществ и осуществлять направленный эффективный поиск биологически активных «соединений-лидеров».

В то же время электрохимические методы анализа, в частности вольтамперометрические, дают возможность разрабатывать простые, экспрессные, чувствительные методики количественного определения электрохимически активных соединений с использованием недорогого и портативного инструментария для контроля качества продукции на производстве, не уступающие широко используемому в настоящее время методу ВЭЖХ. Тогда как в Государственной фармакопее Российской Федерации использование вольтамперометрии для определения веществ практически не представлено. Тем не менее среди зарубежных авторов наблюдается тенденция к использованию вольтамперометрии как альтернативы ВЭЖХ. Фактически метод ВЭЖХ является высокоавтоматизированным и вторым по значимости в контроле качества объектов фармации, но в то же время – дорогостоящим, длительным, требующим высококвалифицированного обслуживающего персонала, а также использования большого количества токсичных растворителей.

Применение нитрогетероциклических и нитроароматических соединений в качестве действующего вещества в ЛС различного действия остается востребованным. Несмотря на то, что такие структуры являются биологически активными и широко применяемыми, механизм их действия в настоящее время до конца не изучен. Одной из причин, обуславливающих биологические свойства нитросоединений, может являться наличие интермедиатов радикальной природы, образующихся в результате восстановления нитрогруппы.

В ряде исследовательских работ представлена связь между биологической активностью нитросоединений и значениями либо потенциала первого пика восстановления, либо потенциала переноса первого электрона, приводящего к образованию радикалов. Показано, что на их возникновение оказывают влияние сферические затруднения, вызванные заместителями в структуре, что, вероятно, влияет на их биологический эффект. Впрочем, этой информации недостаточно для предварительной оценки биологической активности всего многообразия возможных органических нитросоединений. Поскольку на путь электропревращения таких веществ влияет как структура, так и окружение

вещества. В связи с этим требуется индивидуальный, но при этом комплексный подход при интерпретации вероятного пути превращения для каждой оригинальной молекулы.

Таким образом, применение методологии комплексного исследования превращений ряда оригинальных соединений не только даст возможность для понимания вероятной взаимосвязи «структура – физико-химические свойства – биологическая активность», а также выявления нескольких наиболее биологически активных соединений, которые в дальнейшем выйдут на следующие этапы создания ЛС, но и позволит своевременно создавать простые, чувствительные методики количественного определения. В частности, ЭХМИ могут быть успешно применены как для исследований электропревращений соединений, так и для надежного их определения в фармацевтических препаратах.

Работа была выполнена при финансовой поддержке: Российского фонда фундаментальных исследований (проект №.19-29-08015 мк), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации проект № FEUZ-2020-0058 и FEUZ-2023-0021 (№ 075-03-2023-006 от 16.01.2023).

Степень разработанности темы исследования

Структурное сходство азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с известными противовирусными препаратами делает их перспективным базисом для формирования на их основе соединений с полезной биологической активностью. «Соединением-лидером» из данного класса является Триазавирин® (TZV) (натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата), который зарегистрирован на территории РФ и успешно применяется при лечении гриппа, ОРВИ, клещевого энцефалита и недавно возникшего нового штамма вируса из семейства коронавирусов. Структурные аналоги Триазавирин® – натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) и натриевая соль 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-

1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины моногидрата (**TZV-OH**) обладают биологической активностью в отношении различных РНК-вирусов.

Ранее были изучены окислительно-восстановительные превращения веществ из ряда нитроазолоазинов, являющимися друг другу структурными аналогами (Триазавирин® и аргининиевой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидин-7-она моногидрата). Редокс-превращения обоих соединений обусловлены восстановлением нитрогруппы, сопряженной с азогетероциклической системой, и происходят через стадию образования продукта радикальной природы. Как показали исследования, электрохимическое поведение NO₂-группы может отличаться в зависимости от окружения молекулы, условий среды, положения заместителей. Поэтому исследование новых, оригинальных соединений требует индивидуального подхода. Кроме этого, для вольтамперометрического определения этих структурно родственных соединений необходимы разные условия и параметры, что также свидетельствует о необходимости проведения персонализированного анализа.

Использование ЭХМИ, ЭПР-спектроскопии, ВЭЖХ, МСВР и проведение моделирования посредством квантово-химических расчетов позволит создать подход к комплексному исследованию превращений веществ, а также установить взаимосвязь между электрохимическими свойствами и биологической активностью молекулы. Это, в свою очередь, может быть полезно не только для предварительной оценки биологических свойств соединений, но и для интерпретации механизма физиологического воздействия вещества. Кроме этого, результаты, полученные с использованием предлагаемой модели, могут стать основой для направленного синтеза соединений из ряда нитротриазолотриазинов, обладающих большей биологической активностью. С другой стороны, выводы, сделанные в ходе комплексного исследования превращений исследуемых соединений, поспособствуют созданию простых и чувствительных методик количественного определения выбранных «соединений-лидеров» в стандартных образцах.

Целью диссертационной работы является разработка комплексного подхода для исследования структурных аналогов Триазавирина® – натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) с применением инструментальных и расчетных методов, а также методик вольтамперометрического определения выбранных перспективных соединений.

Для осуществления поставленной цели необходимо решить ряд **задач**:

1. Изучить вероятные механизмы электропревращений структурных аналогов Триазавирина® – натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) – в водных средах и апротонных растворителях методами вольтамперометрии: определить лимитирующую стадию процесса, число электронов и протонов, участвующих в реакции, установить зависимость влияния доноров протонов на процесс электропревращения.

2. Исследовать и установить возможную структуру промежуточных и конечных продуктов натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**), образующихся в процессе электровосстановления изучаемых соединений с использованием комбинированных

методов: вольтамперометрии/ЭПР-спектроскопии, ВЭЖХ, МСВР, квантово-химических расчетов.

3. Разработать комплексный подход, включающий инструментальные и расчетные методы, для исследования соединений из ряда натриевых солей 3-нитро-4-**X-7-R**тио-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинидов, результаты которого позволят обоснованно выбрать вещества с вероятно наибольшей биологической активностью.

4. Изучить влияние материала трансдьюсера и режимов регистрации вольтамперометрических измерений на аналитический сигнал соединений натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-этил**тио-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) и натриевой соли 3-нитро-4-**гидрокси-7-метил**тио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**).

5. Разработать методики вольтамперометрического определения соединений натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-этил**тио-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) и натриевой соли 3-нитро-4-**гидрокси-7-метил**тио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) в стандартном образце.

Научная новизна результатов исследования

Изучены особенности электропревращения натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-этил**тио-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-пропил**тио-[1,2,4]триазоло-[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-бутил**тио-[1,2,4]триазоло-[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-**гидрокси-7-метил**тио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**). Выявлены закономерности влияния рН среды, заместителей на электровосстановление этих веществ.

Показано, что электропревращения структурных аналогов Триазавирин® – натриевой соли 3-нитро-4-**гидрокси-7-метил**тио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) и натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-метил**тио-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**TZV**), натриевой соли 3-нитро-4-**оксо-7-этил**тио-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**),

натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**) и натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) – протекают по различным путям.

Показано, что необратимое четырехэлектронное восстановление натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) протекает в две ступени, а у натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) – в одну, через образование анион-радикалов до гидросиламинов, аминов и продуктов димерного строения. Электровосстановление **всех соединений** происходит в виде протонированных частиц в водной среде, в апротонной среде в виде ионных пар с катионами натрия.

Теоретическая значимость работы

Продемонстрировано, что несмотря на структурную схожесть соединений, кинетика их электропревращений различна: для натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) реакция **лимитируется диффузией**, у натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**) – **диффузией, осложненной предшествующей химической реакцией**. Установлено наибольшее количество интермедиатов радикальной природы, образующихся в процессе электровосстановления, у натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**). Выделены и охарактеризованы промежуточные и конечные продукты электровосстановления изучаемых соединений.

Предложены возможные механизмы электровосстановления натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Bu**), натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**).

Предложен комплексный подход для исследования механизмов превращений натриевых солей 3-нитро-4-Х-7-Ртио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинидов, результаты которого хорошо согласуются с данными биофизических экспериментов.

Практическая значимость работы

Исследовано влияние различных марок углеродных паст, применяемых при изготовлении толстопленочных электродов, на аналитический сигнал, полученный от натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**).

Разработана методика вольтамперометрического определения натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-OH**) в стандартном образце на стеклоуглеродном электроде) при рН 2,0 и 7,0. Диапазон линейности в обоих случаях составил 10–300 мг/дм³, предел обнаружения 1,3 и 1,7 мг/дм³ соответственно. Предел количественного определения 4,1 и 5,2 мг/дм³ соответственно. В рамках выбранного диапазона концентраций была доказана правильность.

Разработана методика вольтамперометрического определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) в стандартном образце на СУЭ и толстопленочном углеродсодержащем электроде при рН 7,0. Диапазон линейности на СУЭ составил 10–300 мг/дм³, ПО 1,3 и ПКО 4,0 мг/дм³. С использованием ТУЭ диапазон линейности 10–500 мг/дм³, ПО 1,2 и ПКО 3,6 мг/дм³.

Созданные методики вольтамперометрического определения натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида

моногидрата (**TZV-OH**) и натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Et**) были опробованы, признаны пригодными в компании ООО «Завод Медсинтез» и будут внедрены в технологический процесс в случае промышленного производства потенциальных лекарственных противовирусных препаратов

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования электропревращений структурных аналогов Триазавирин® – натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды моногидрата (**TZV-OH**); строение их промежуточных и конечных продуктов.

2. Вероятные механизмы электропревращений структурных аналогов Триазавирин® – натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды моногидрата (**TZV-OH**) и их сравнение.

3. Комплексный подход для исследования соединений из ряда натриевых солей 3-нитро-4-Х-7-Ртио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныдов.

4. Результаты исследования влияния материала трансдьюсера, режимов регистрации вольтамперограмм на аналитический сигнал натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды дигидрата (**Et**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныды моногидрата (**TZV-OH**).

5. Новые вольтамперометрические методики количественного определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-

c][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-c][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV- OH**) в стандартных образцах.

Методология и методы диссертационного исследования

Изучение электропревращений соединений с установлением принадлежности электрохимического отклика; обратимости/необратимости процесса; количества электронов, участвующих в процессе; кинетики лимитирующей стадии было проведено методами циклической вольтамперометрии, в том числе с использованием температурно-кинетического метода и хроноамперометрии.

Прямая ЭПР-спектроскопия, комбинированный метод (ЭПР-спектроскопия и циклическая вольтамперометрия/хроноамперометрия), метод регистрации ЭПР-спектров с ловушками и зондами в совокупности с моделированием посредством квантово-химических расчетов были применены для установления наличия и структуры парамагнитных радикальных частиц.

Квантово-химические расчеты были выполнены в ORCA ver. 5.0.3 с использованием метода теории функционала плотности гибридного функционала B3LYP в тройном-зета базисе с двумя поляризационными функциями def2-TZVPP с поправкой атомно-парной дисперсии со схемой Бекке-Джонсона (D3BJ). Симуляция и визуализация расчетных ЭПР спектров была выполнена в модуле EasySpin 5.2.35 программного пакета MATLAB.

Различные режимы регистрации вольтамперограмм (линейный, квадратно-волновой, дифференциально импульсный) были использованы для разработки методик количественного определения. Метод трафаретной печати был применен для изготовления толсто пленочных углеродсодержащих электродов.

Определение величин pK_a для исследуемых соединений было проведено с применением потенциометрического и оптического метода. Препаративный электролиз совместно с высокоэффективной жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией высокого разрешения были использованы для получения и идентификации промежуточных и конечных продуктов редокс-реакции.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность представленных в настоящей работе результатов подтверждается применением современных физико-химических методов исследования и анализа, обеспечена использованием высокоточным сертифицированным, поверенным и аттестованным контрольно-измерительным оборудованием известных мировых производителей, которое расположено на базе Химико-Технологического института УрФУ и Научно образовательного и Инновационного центра химико-фармацевтических технологий УрФУ; проверенного программного обеспечения, современных средств и методов проведения исследований (квантово-химическое моделирование). Экспериментальные данные характеризуются высокой воспроизводимостью; а также хорошей сходимостью результатов теоретических расчетов, моделирования с экспериментальными данными.

Апробация работы

Основные результаты проведенных исследований доложены в докладах на всероссийских и международных конференциях: V, VII, VIII Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2021, 2023, 2024), XXXII, XXXIII Российская молодёжная научная конференция с международным участием «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2022, 2023), IX международная молодежная научная конференция «Физика. Технологии. Инновации» (Екатеринбург, 2022), XI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024» (Екатеринбург, 2024).

Публикации

Основные результаты работы были опубликованы в 13 научных работах, в том числе в 3 научных статьях в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ и входящих в международную библиографическую базу *Scopus* и *Web of Science* для публикации

результатов, и 10 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях.

Личный вклад автора состоит в сборе, систематизации и анализе литературных данных; постановке целей и задач исследования; планировании и выполнении исследований и обработке полученных результатов; в написании статей и выступлениях с докладами на различных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 133 печатных страницах и содержит 32 рисунка и 15 таблиц. Список литературы включает 172 наименований работ российских и зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Авторы некоторых работ в своей практике активно используют электрохимические методы исследования для изучения редокс-превращений соединений [1–6]. Существуют определенные аналогии между электрохимическими и биологическими реакциями, относящимися к механизмам электронного переноса, которые не воспроизводятся в других химических системах. Электрохимические свойства биологически важных соединений могут быть очень ценными для выяснения окислительно-восстановительных реакций, происходящих в организме человека, обеспечивая подобие тому, что происходит *in vivo*. Такие исследования приводят к пониманию метаболизма *in vivo*, что имеет решающее значение для получения новых ЛС, клинической фармакологии, токсикологии [2, 3]. Необходимо учитывать, что в клетках человека происходит множество параллельных процессов, которые затрудняют установление абсолютной связи между электрохимическими параметрами вещества и его биологической активностью. Поэтому необходима совокупность исследований, показывающих возможные пути превращения соединений в организме человека.

Известно, что препараты на основе нитросоединений подвергаются окислительно-восстановительным превращениям в организме человека, одним из результатов которого является образование метаболитов радикальной природы, вероятно, имеющих отношение к механизму действия таких ЛС. Вардман, Кеддерис и Виоде [7–9] показывают, что биологическая активность нитросоединений может быть связана с наличием интермедиатов радикальной природы, образующихся в результате ее восстановления. В последующих работах авторы [2, 3] провели корреляцию между потенциалами первого пика восстановления онкопрепаратов, содержащих нитрогруппу, в водных средах при рН 7,0, с их цитотоксичностью и биологической активностью. Показано, что чем сильнее смещен потенциал пика восстановления нитрогруппы в положительную область, тем биологическая активность препарата выше, а цитотоксичность ниже.

Поэтому для предварительной оценки эффективности онкопрепаратов авторы предложили использовать потенциал первого пика нитрогруппы. В работе [4] авторами предлагается для рассмотрения в ряду схожих структур не потенциал первого пика восстановления, а потенциал переноса первого электрона, значения которого получены методом анаэробного импульсного радиолиза, и обуславливающих образование радикалов. Другие авторы показывают [10–12], что на восстановление нитрогруппы и, как следствие, образование интермедиатов радикальной природы оказывают влияние сферические затруднения, вызванные заместителями в структуре, что, возможно, влияет на их биологический эффект. Электропревращения таких соединений зависят не только от рН среды, но и от положения заместителей в структуре вещества. Поэтому для каждой оригинальной молекулы требуется индивидуальный подход. Кроме того, при разработке методики количественного определения следует знать механизм редокс-превращений для получения оптимального аналитического сигнала.

С другой стороны, наблюдается тенденция к применению квантово-химических расчетов для установления возможного биологического эффекта соединения, в том числе и причин, обуславливающие их биологические свойства. Однако, на данный момент времени, учет всех возможных процессов, возникающих в организме человека, не представляется возможным. Тем не менее, эти данные могут служить дополнением к результатам электрохимических исследований для интерпретации природы возникновения биологического эффекта.

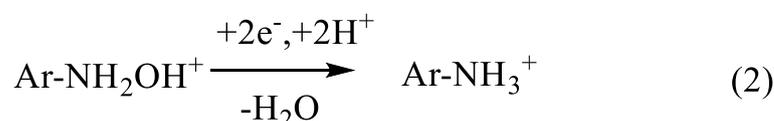
Стоит отметить, что в литературе не представлены совокупности исследований по изучению возможного механизма превращений соединений с применением инструментальных методов и квантово-химических расчетов для установления зависимости между путями их превращений и их биологической активностью. Создание методологии комплексного исследования возможных превращений уже синтезированных соединений с использованием физико-химических методов, в том числе для предварительной оценки их биологической активности, представляется полезным. Разработка такого подхода, возможно, приблизит к пониманию связи между биологической активностью и физико-

химическими свойствами вещества, поможет создать пути синтеза и исследования новых молекул. Кроме того, результаты этой методологии могут быть использованы, в частности, при изучении механизма редокс-реакции для выбора рабочего аналитического сигнала с целью разработки методики количественного определения «соединения – лидера».

1.1 Пути и механизмы электропревращения ароматических нитросоединений

1.1.1 Электрохимическое превращение нитросоединений в водной среде

Методом полярографии было исследовано электровосстановление нитробензолов и его структурных аналогов и были показаны существенные различия в их путях, обусловленные различной рН среды. Так в диапазоне рН от 0 до 5 наблюдаются 2 полярографические волны, первая из которых соответствует сначала образованию протонированного фенилгидроксиламина (1), а при более отрицательных потенциалах – дальнейшему восстановлению протонированного гидроксиламина до иона фениламмония. В ряде работ говорится о том, что в водных растворах электровосстановление простых ароматических гидроксиламинов происходит в виде протонированных форм (2) [13–22].

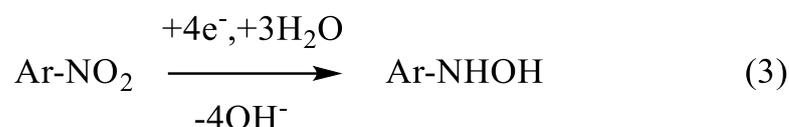


Стоит отметить, что аббревиатура $(\text{Ar-NO}_2)\text{H}^+$ указывает на возможность образования электроактивных частиц в виде нейтральных нитробензолов с водородными связями или монопротонированных частиц в зависимости от структуры Ar и рН окружающей среды [22, 23].

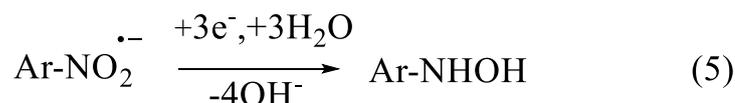
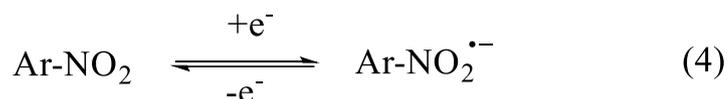
В работах [22, 24–27] было продемонстрировано, что Ar-NO легче восстанавливать, чем Ar-NO₂ в сравнимых условиях и, следовательно, Ar-NO

обычно является промежуточным продуктом, а не продуктом восстановления ароматических нитросоединений. Присутствие нитрозобензола в качестве промежуточного продукта было показано путем добавления *p*-толуолсульфиновой кислотой [28].

Электровосстановление нитробензола прекращается на стадии Ar-NHOH [20, 22] в растворах с нейтральным значением pH (3), указывая на то, что непротонированные гидроксиламины не восстанавливаются в пределах потенциального окна, определяемого водными растворами.



В щелочных средах форма кривой, полученная посредством присоединения четырех электронов, меняется на одноэлектронную волну, соответствующую образованию анион-радикала (4), и трехэлектронную волну (5) [18, 20, 29, 30]. Это может свидетельствовать о медленном протонировании анион-радикала в щелочных средах, подобном тому, которое наблюдается в апротонных растворителях.



Восстановление нитробензола вплоть до гидроксиламина в трех различных диапазонах pH может быть описано, как показано на рисунке 1.1.

Таким образом, показано влияние pH среды на процесс электровосстановления нитрогруппы, которое протекает через образование анион-радикала нитрозопроизводного. В одной из работ было показано [31], что образование и продолжительность существования интермедиатов радикальной природы коррелируют с мерой повреждения, которую нанести биомолекулам. Чем медленнее скорость разложения нитрорадикальных анионов (или легче

их образование), тем ущерб, нанесенный биомолекулам, будет больше, а процесс будет происходить быстрее. Возможно, что именно наличие радикальных частиц является одной из причин появления биологических свойств у соединений. Поскольку именно первый пик восстановления соответствует образованию интермедиата радикальной природы, то далее будет рассмотрено влияние строения вещества на величину потенциала пика восстановления нитросоединения.

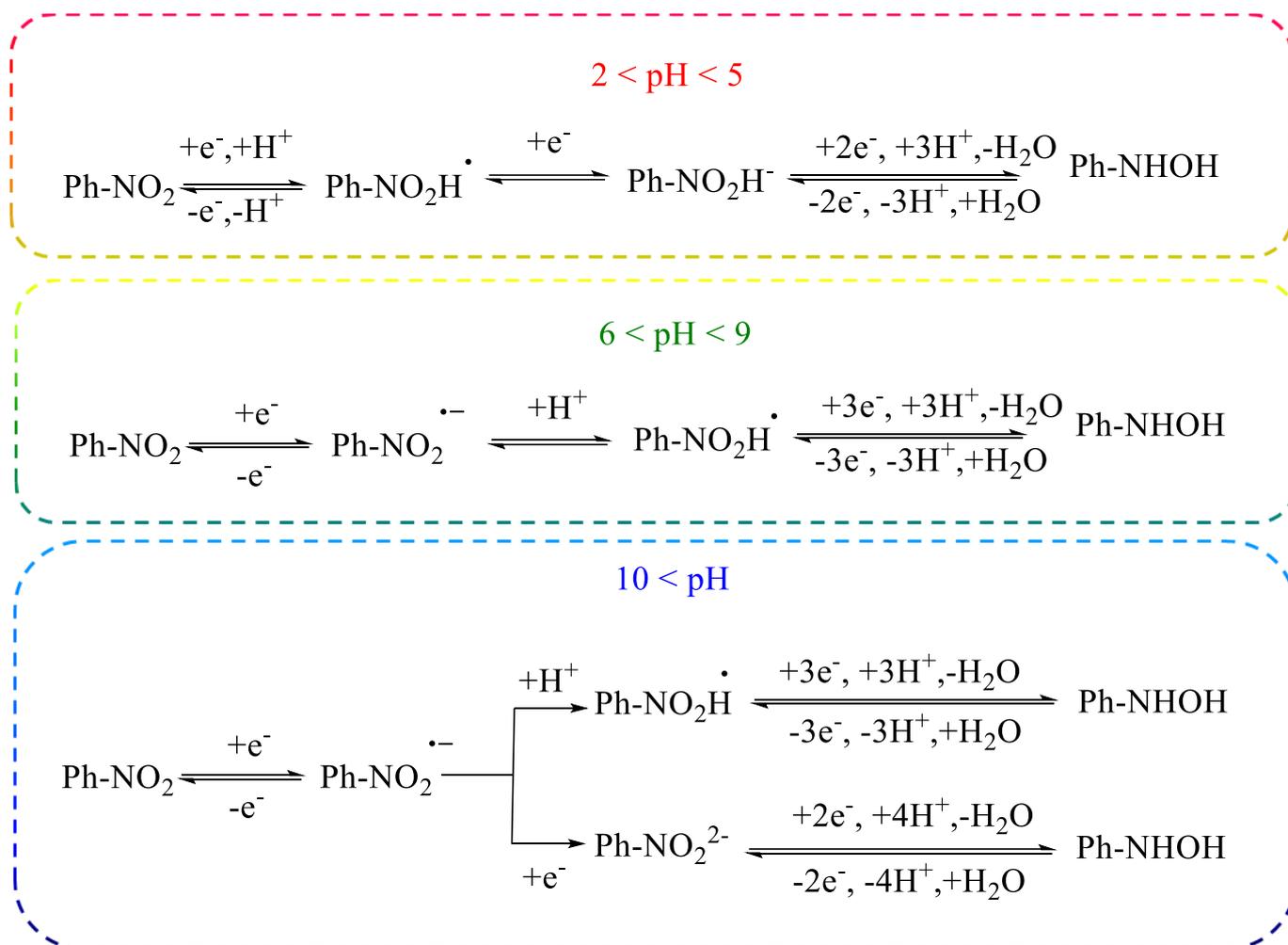


Рисунок 1.1 — Пути электропревращения фенолзамещенных нитросоединений в водной среде при различных pH

Использование импульсного радиолиза позволило установить последовательность, в которой потенциал первого пика восстановления (E_c), соответствующий образованию радикала, смещается в катодную область в ряду соединений: нитропиридины > нитрофураны > нитротифены > нитробензолы > нитроимидазолы. Показано, что для ряда гомологичных соединений значения E_c

незначительно различаются. Кроме того, значение E_c становится отрицательнее, если нитрогруппа теряет близость к ароматической системе из-за стерических затруднений [4].

Продемонстрировано влияние на процесс электровосстановления нитрогруппы в 4-нитро-N-бензамиде за счет введения нитрогруппы, в качестве заместителя в *орто*-, *мета*- или *пара*-положения: меняется не только форма всей циклической вольтамперограммы, но и потенциал первого пика восстановления, который смещается в более положительную область. Так, без включения NO_2 - группы ($E_c = 585$ мВ), с введением в *орто*-, *мета*- и *пара*-положения (480, 525, 485 мВ, соответственно) [32].

В случае производных сульфонилгидразона введение в структуру нитрогруппы в *пара*-положение, в отличие от *мета*-положения, приводит к смещению потенциала в более анодную область. Включение NO_2 -группы в *пара*-положение предпочтительнее для образования долгоживущего анион-радикала и, как следствие, для проявления более высокой биологической активности [33].

Вышеуказанные данные позволяют считать, что внедрение заместителей в различные положения молекулы и сопряжение нитрогруппы с ароматическими/гетероциклическими остовами оказывают влияние на потенциал первого пика, характеризующего возникновение интермедиатов радикальной природы. Далее будут рассмотрены основные принципы образования анион-радикала.

1.1.2 Образование анион-радикалов в процессе электровосстановления нитросоединений в апротонной среде и их протонирование

В апротонных растворителях, таких как ацетонитрил [34–37], ДМСО [36], ДМФА [35, 38–44], дихлорметан [45], ТГФ [35], почти всегда можно наблюдать этап электрохимического восстановления нитробензола до образования стабильного анион-радикала. С другой стороны, для многих замещенных нитробензолов

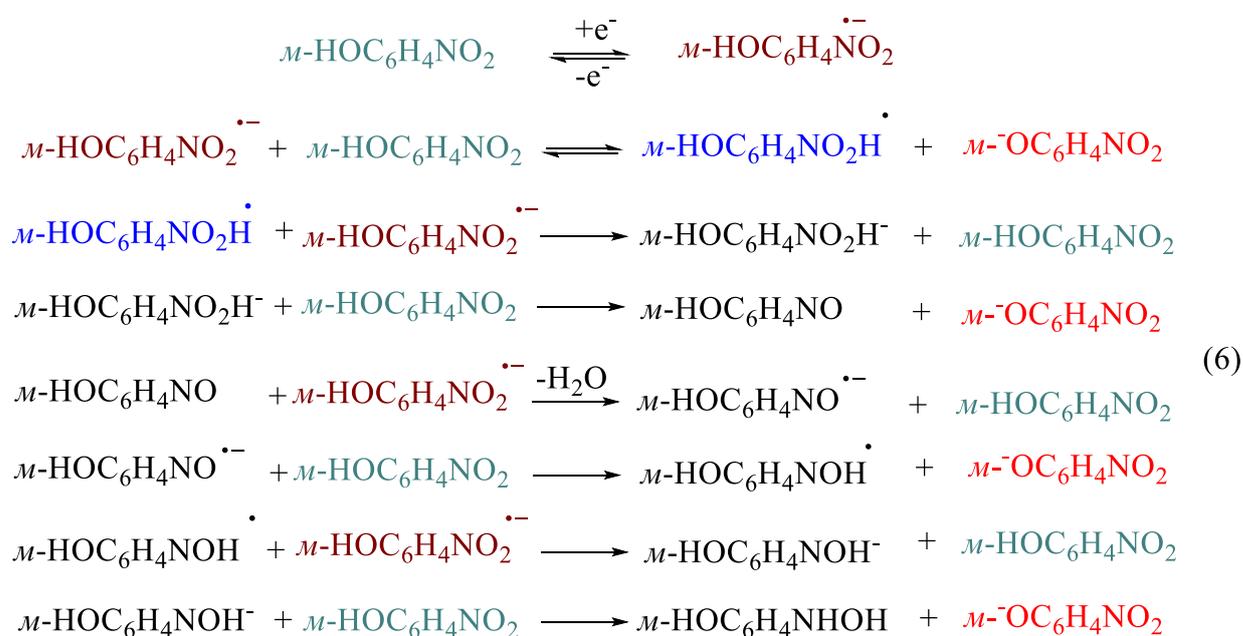
[25,46 – 51] и других ароматических [52–54] или гетероароматических нитросоединений [55–62] также характерно наличие стабильного анион-радикала. Гетероароматические соединения, в которых присутствуют атомы водорода, например 1,3,5-тринитробензол [43, 63–64] 3,5-нитропиридин [64] и 9-нитроантрацен [43,64], способны протонировать анион-радикалы и образовывать нестабильные анион-радикалы, причиной чему является наличие высокой локальной спиновой плотности, приводящей к реакции димеризации. Кроме того, нестабильные анионы-радикалы образуются у соединений, содержащих потенциально уходящую группу, например, галогенид-ион [65].

Для увеличения времени жизни (стабильности) радикала в нитробензоле необходимо наличие в *para*-положении электроноакцепторных заместителей –CN, –NO₂, –COR. Наличие электронодонорных заместителей, напротив, затрудняют восстановление нитросоединений [34, 44, 66]. Показано, что потенциал восстановления смещается в более анодную область при включении заместителей в *para*-положение в таком порядке: NH (CH₃) < NH₂ < OCH₃ < CH₃ < H < ОСО (CH₃) < Cl < CF₃ < СО(CH₃) < СО(H) < CN < NO₂ [34].

Дальнейшее восстановление анион-радикала нитробензола до соответствующего дианиона протекает в отсутствие доноров протонов, в том числе остаточной воды [67]. Менее реакционноспособные дианионы наблюдаются у нитробензолов, несущих фенильные заместители [68], одну или несколько дополнительных нитрогрупп [25, 43, 69–73] или другую электроноакцепторную группу, например, нитрозо- [71], азо- [74], карбонилгруппу [49], метилсульфонил [75].

Резюмируя вышеизложенное, образование анион-радикала наблюдается у ароматических, гетероароматических нитросоединений. Введение различных заместителей в структуру веществ влияет на стабильность (долго живучесть) анион-радикалов. Кроме этого, существенное влияние оказывают атомы водорода, приводящие к реакции самопротонирования, что приводит к уменьшению времени жизни анион-радикала. Исходя из этого, необходимо рассмотреть влияние протонов на путь образования интермедиатов радикальной природы в апротонных средах.

Кислотность остаточной воды, присутствующей в обычно используемых апротонных растворителях, недостаточна для протонирования анион-радикала нитробензола при регистрации вольтамперограмм с медленной скоростью развертки [67]. Известно, что реакция протонирования протекает, когда нитробензол выступает в роли кислоты из-за наличия фенольной или карбоксильной группы в структурной формуле нитробензола. В этом случае, а также в отсутствие преднамеренно добавленных кислот, первоначально образовавшийся анион-радикал протонируется субстратом в ходе так называемой реакции самопротонирования, что показано на примере восстановления *m*-нитрофенола до *m*-гидроксиламинофенола в ДМСО (6) [76, 77].



Эта конкретная последовательность реакций приводит к общей стехиометрии $0,8\Phi$ (7).



Аналогичная схема реакций описывает восстановление нитробензойных кислот [78], нитроимидазолов, нитроиндолов [55, 79] нитробензолсульфонамидов [80]. Однако наблюдаются различия при восстановлении *n*-нитрофенола [77, 81, 82]. В этом случае *n*-гидроксиламинофенол подвергается быстрой дегидратации до хинонимина, который в данных условиях далее восстанавливается до *n*-аминофенола с присоединением

дополнительно двух электронов и двух протонов. Исходя из этого, стехиометрия в этом случае и для *m*-нитрофенола изменяется до общего процесса $\sim 0,85 \Phi$ (7).

Тем не менее, в работе [57] показано, что анионы-радикалы 3- нитро- 1,2,4- триазол-5-онов, которые также несут подвижные атомы водорода, в ацетонитриле подвергаются таутомерии, но, по-видимому, не самопротонированию.

Рассмотренные варианты электровосстановления нитросоединений показывают, что механизмы превращения сложны, разнообразны и существенно зависят от условий среды, строения вещества, а в некоторых случаях имеют индивидуальный характер. Так, в случае Триазавирин[®] и его структурного аналога (аргининиевой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидин-7-она моногидрата), являющихся родственными веществами исследуемых в данной диссертационной работе соединений, наблюдались различия даже первой стадии электровосстановления нитрогруппы. В связи с развитием компьютерных технологий для уточнения, в том числе, и механизма электропревращений соединений используется квантово-химическое моделирование. Поэтому далее представлена небольшая выборка применения цифровых технологий при исследовании влияния структуры вещества на процесс восстановления нитросоединений и оценки электрохимических параметров, включая их возможную связь с биологическими данными.

1.1.3 Цифровые методы в исследовании механизмов превращений соединений

Рассчитанные квантово-химические параметры позволили установить влияние заместителей нитрогруппы на энергетические и электронные свойства соединений хинонов, пуринов, карбазолов [83]. Показано, что внутримолекулярные взаимодействия нитрогруппы с другими заместителями из разных положений могут сильно влиять на π -электронную делокализацию ароматического кольца. Совместное влияние нитрогруппы и электронодонорных заместителей на сопряженную структуру усиливается, т.е. возникает сильный резонансный

эффект. Разработанная модель позволяет количественно показать более сильное влияние электронодонорных заместителей на нитрогруппу, чем электроноакцепторных в различных системах.

Большинство компьютерных исследований было использовано для получения и оценки значений E_{red} ($\text{ArNO}_2/\text{ArNO}_2^{\cdot-}$) для генерации стойкого анион-радикала посредством обратимого переноса одного электрона при первом волновом потенциале в апротонном состоянии [1].

В работе [43] показана линейная корреляция между значениями потенциалов восстановления соединений из ряда нитроаренов и с расчетными на уровне теории DFT значениями E_{LUMO} [34, 84], предполагая, что изменение энергий сольватации и других свойств, связанных с переносом электрона, обычно изменяется постепенно в ряду родственных соединений.

Показана сходимость результатов значений пиков восстановления нитроароматических соединений, обуславливающих образование радикалов, с расчетными данными ферментативного одноэлектронного восстановления. Установлена линейная зависимость между формальными потенциалами восстановления, индексом электрофильности и E_{LUMO} для ряда паразамещенных нитробензолов. Электронодонорную способность группы R в $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ можно количественно оценить с помощью рассчитанных параметров: индекса электрофильности, энергии HOMO и относительной электроотрицательности, а также экспериментально измеренных величин: формального потенциала восстановления, ЯМР ^1H и ^{13}C [85].

Авторы [86] показали перспективу применения квантовых расчетов, а именно расчет энергии сродства к электрону с использованием функции Хартри – Фока в совокупности с электрохимическими свойствами соединений. Множественный линейный регрессионный анализ 35 нитроароматических соединений показал, что смещение потенциала восстановления в анодную область на 100 мВ может увеличить биологическую эффективность вещества в 10 раз, а также возрастает токсичность. Обнаружено, что цитотоксические свойства многих соединений коррелируют с потенциалом одноэлектронного восстановления.

Приведенные выше данные показывают применимость квантово-химических расчетов для уточнения не только механизма электропревращения, но и использования электрохимических и цифровых параметров для предсказания потенциально биологически активного вещества из ряда ему родственных.

С другой стороны, из-за быстрого развития компьютерных технологий и усовершенствования используемых алгоритмов, одним из самых мощных и часто используемым в последние 20 лет цифровых инструментов, применяемым, в том числе для уточнения именно механизма превращения соединений, является молекулярный докинг [87]. Наблюдается тенденция использования молекулярной динамики в тандеме с молекулярным докингом для скрининга *in silico* больших библиотек малых молекул [88–93]. Это позволит ускорить идентификацию и оптимизацию «соединения – лидера», который станет основной при разработке лекарственного средства с определенными биологическими свойствами. Молекулярный докинг позволяет предсказывать наиболее вероятные способы связывания лиганда с белком известной трехмерной структуры, а молекулярная динамика служит дополнением для оценки термодинамических и кинетических параметров, связанных с распознаванием и связыванием соединений с мишенью [94–98]. Например, совокупность этих методов позволила определить и целевую мишень – белок A42R вируса оспы – и родственное к ней вещество для лечения оспы, являющейся значимой проблемой здравоохранения в 2022 году [99]. Также на основании данных, полученных путем молекулярного моделирования, объясняется противовоспалительный механизм соединений [100].

Однако, как показывают исследования, основной проблемой при моделировании, с точки зрения молекулярной динамики, соединений (потенциальных лекарственных средств) является прогнозирование кинетических параметров [101, 102]. Отмечено, что особую важность при проведении молекулярного докинга играет правильность выбора алгоритма стыковки конформера и лиганда [103, 104]. В противном случае неподходящие параметры стыковки делают затруднительным практическое применение докинга, что ведет к потенциальным рискам сбоя прогнозирования на ранних стадиях [103, 105].

Поэтому использование только цифровых технологий как ключевого метода для оценки и выбора перспективного соединения для формирования на его основе лекарственного средства с определенными биологическими свойствами является не всегда благоприятным. Для более точного понимания процессов и выбора «соединения – лидера» необходимо получать данные, посредством использования как цифровых технологий, так и инструментальных методов.

Информация о пути электропревращения оригинального, нового соединения необходима для получения аналитического сигнала с наилучшими электрохимическими параметрами при разработке методики количественного определения. Это необходимо, поскольку одним из ключевых этапов коммерциализации препарата является создание методики его количественного определения для контроля качества продукции на производстве. Более того, наличие готовой методики определения позволяет ускорить процесс создания нового, оригинального лекарственного средства и его появление в аптечной сети.

1.2 Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе

В мировой практике для разработки способа количественного определения действующего вещества в ЛС используют различные инструментальные методы [106]. Однако их применение не во всех случаях является выгодным. Тем временем многообразие и универсальность электрохимических методов анализа позволяют решать задачи фармацевтического контроля. Наибольшее внимание привлекает вольтамперометрический метод (ВА) из-за высокой селективности, чувствительности, экспрессности, отсутствия использования дорогостоящего и сложного оборудования. При этом использование ВА возможно только для электроактивных молекул. В Государственной фармакопее Российской Федерации использование ВА для определения веществ практически не представлено. Впрочем, среди зарубежных авторов наблюдается тенденция к использованию ВА как альтернативы ВЭЖХ [106], поскольку определяемые аналитические характеристики методом ВА сопоставимы с ВЭЖХ.

Например, в работе [107] разработан способ количественного определения сульфазидина в фармацевтических препаратах методом прямой катодной вольтамперометрией на стеклоуглеродном электроде, модифицированном висмутовой пленкой. Предел обнаружения данного метода составил $2,1 \text{ мкмоль/дм}^3$, а ВЭЖХ метода – $0,4 \text{ мкмоль/дм}^3$. Другим примером является способ количественного определения противоэпилептического лекарственного средства карбамазепина на СУЭ, модифицированным многостенными углеродными нанотрубками в фармацевтических препаратах с ПО- 40 нмоль/дм^3 , а ВЭЖХ – 40 нмоль/дм^3 . Результаты, полученные с использованием предложенного метода для количественного определения карбамазепина в коммерчески доступных лекарственных таблетках и в пробах сточных вод, согласуются с результатами, полученными методами ВЭЖХ-УФ и ЖХ-МС [108]. Таким образом, аналитические параметры, полученные методами ВЭЖХ и ВА, оказались близки. Это подтверждает возможность использования ВА как альтернативы ВЭЖХ.

Еще одним преимуществом использования ВА вместо ВЭЖХ является одновременное определение нескольких веществ без предварительного их разделения, что необходимо для анализа как в фармацевтических препаратах, так и в биологических жидкостях. В работе [109] продемонстрировано одновременное определение ацетаминофена (АЦМ) и мефенаминовой кислоты (МФК) на образцах сыворотки крови человека, мочи человека и лекарственных препаратов методом ДИП-вольтамперометрии на СУЭ, модифицированном многостенными углеродными нанотрубками/модифицированными хитозаном с ПО $0,66 \text{ мкмоль/дм}^3$ и $0,6 \text{ мкмоль/дм}^3$ для МФК и АЦМ, соответственно. Еще одним примером является независимое определение двух β -адреноблокаторов – пропранолола и атенолола – в фармацевтических препаратах с использованием КВВ и алмазного электрода, легированного бором, в $0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ или $0,5 \text{ моль/дм}^3 \text{ NaNO}_3$ [110]. Предложенный метод был успешно применен при определении обоих веществ в нескольких фармацевтических формах (таблетках), при этом рассчитанные аналитические характеристики для ВА и спектрофотометрического метода, в том числе ВЭЖХ, оказались близки.

Кроме этого, вольтамперометрия может применяться для определения следовых количеств лекарственного средства в биологических жидкостях. В работе [111] продемонстрировано определение цефиксима на ртутном капаящем электроде с использованием дифференциально-импульсной катодно-адсорбционной индуктивной вольтамперометрии и прямоугольной катодно-адсорбционной индуктивной вольтамперометрии (ПО 3,99 нг/см³). Для определения следовых количеств омепразола в водном растворе использовали метод адсорбционной инверсионной вольтамперометрии на пиролизическом графитовом электроде с краевой плоскостью методом. Диапазон концентрации составил (от 0,01 до 4,0 мкмоль/дм³), что является довольно низкоконтрационным, ПО – 3,0 нмоль/дм³ [112].

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что вольтамперометрические методы являются хорошей альтернативой методам ВЭЖХ для анализа лекарственных форм. Преимущества вольтамперометрии заключаются в высокой чувствительности, экспрессности, минимальной пробоподготовке, удовлетворительной селективности, широкой применимости.

Анализ литературных данных показал, что при использовании электрохимических методов анализа для количественного определения нитросоединений наибольшей практической ценностью обладает сигнал, связанный с электровосстановлением нитрогруппы. Такой сигнал имеет ряд преимуществ: большое количество тока, вырабатываемое на моль электроактивного вещества; сравнительно низкая потребность в энергии для его восстановления. Благодаря этому появляется возможность достичь высокого отношения тока к концентрации при низких потенциалах. Следствием чего является возможность применения электрохимических методов с получением высокой чувствительности.

Поскольку объектами анализа в данной диссертационной работе являются нитрогетероциклические соединения из ряда азолазинов, то предоставляется интересным рассмотреть способы вольтамперометрического определения, включая

рабочие условия и выбор материала электрода, лекарственных препаратов, действующим веществом которых является электроактивная нитрогруппа.

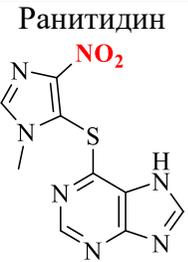
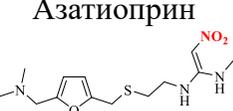
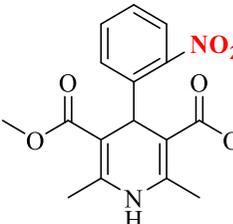
1.2.1 Вольтамперометрическое определение нитросодержащих лекарственных средств

Для вольтамперометрического определения лекарственных препаратов на основе гетероциклических и ароматических нитросоединений используются как различные режимы (ЦВА, ЛР, КвВ, ДИП, ИВА, АдИККвВ и т.д.), так и различные виды электродов (СУЭ, РКЭ, УЭ). Более того, для увеличения чувствительности электрода при анализе следовых количеств в питьевой продукции проводится модификация поверхности электрода, например, наночастицами оксидов/солей различных металлов, а также многостенными углеродными нанотрубками и т.д. Основное же предназначение разработки таких методик – определение содержания действующего вещества в биологических жидкостях, различных формах лекарства. В таблице 1.1 представлен обзор основных параметров вольтамперометрического определения нитросодержащих лекарственных средств.

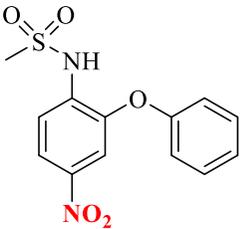
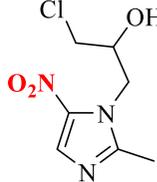
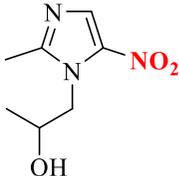
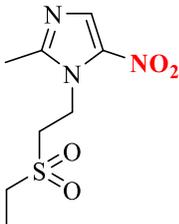
Из приведенных данных следует, что требуется индивидуальный подбор как режима регистрации, так и его параметров, а также выбор материала электрода для разработки методики количественного определения лекарственных препаратов на основе нитросоединений с низкими пределами обнаружения и количественного определения. По-видимому, это связано с тем, что на восстановление нитрогруппы влияет как окружение молекулы, так и условия среды.

Учитывая, что объектами анализа являются соединения, являющиеся друг другу структурными аналогами, то необходимо рассмотреть влияние структуры вещества на режим и параметры вольтамперометрического определения.

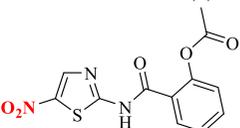
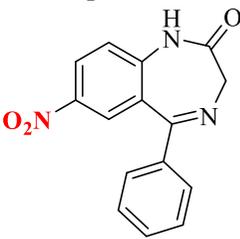
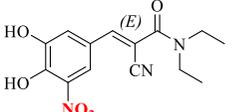
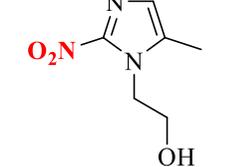
Таблица 1.1 – Условия и параметры для вольтамперометрического определения электрохимического отклика нитросодержащих лекарственных средств с использованием различных видов рабочих электродов

Группа препаратов	Определяемое вещество	Среда	Тип электрода	Режим регистрации	Диапазон линейности, мг/дм ³	ПО/ПКО, мг/дм ³	Объект анализа	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Иммуно-стимулятор	Ранитидин 	0,1 М КСl	СУЭ	АДИККВВ	0,033–3,3	–	Сыворотка крови	[113]
Противо-язвенный	Азатиоприн 	ББР (рН 6,2)	СУЭ	АДИККВВ	0,000054–0,0273	0,0001/0,0003	Моча, таблетки	[114]
Антианги-нальный	Нифедипин 	0,05 М NaOH	УЭ@ МУНТ-β-циклодекстрин	ДИП	0,00024–0,052	0,00007	Сыворотка крови, таблетки	[115]

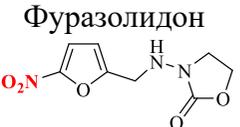
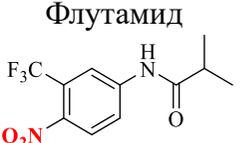
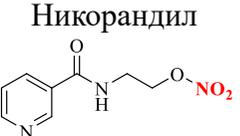
Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Противо-воспалительный препарат	<p>Нимесулид</p> 	ФБР (рН 2,0)	СУЭ@ частицы SiC	ДИП	0,0003–0,003	0,0001	Сыворотка	[116]
Противо-протозойное	<p>Орнидазол</p> 	ББР (рН 9,5)	РКЭ	ДИП	0,87–876	0,08/0,27	Таблетки	[117]
	0,0002–0,02				0,0005/0,0014			
	<p>Секнидазол</p> 	ББР (рН 7,0)	СУЭ	ДИП	0,0001 – 0,01	0,0004/0,013	Таблетки	[118]
<p>Тинидазол</p> 	0,00025 – 0,025				0,0007/0,002			

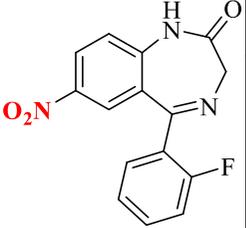
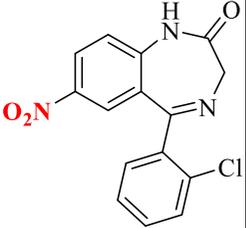
Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Противо- паразитар- ное	Нитазоксанид 	ББР (рН 4,0)	РКЭ	АДИККВВ	0,0003–0,061	0,0001/0,0003	Лекарства, сыворотка	[119]
		ФБР (рН 5,6)	УЭ	ДИП	0,12–3,07	0,02/0,07	Лекарства	[120]
		ББР (рН 8,4)	РКЭ	ДИП	–	0,083	Лекарства	[121]
		ФБР (рН 5,6)	УЭ	ДИП	0,12–3,1	0,02/0,07	Сыворотка	[120]
Противо- судорожное	Нитразепам 	АБР (рН 5,7)	РКЭ	ДИП	140–280	0,013/0,04	Лекарства	[122]
Противо- паркинсо- нические	Энтакапон 	ББР (рН 2,5)	РКЭ	АДИККВВ	4,8–48	0,013/0,04	Лекарства	[123]
Противо- протозой- ное	Нитромидазол 	ФБР (рН 7,0)	СУЭ@графе н	ДИП	0,017–4,28	0,008	Лекарства	[124]

Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Противо-микробное	Фуразолидон 	ББР (рН 6,0)	СУЭ@МУНТ	ЦВА	0,675-180	0,52	Лекарства (таблетки)	[125]
Противо-микробное	Нитроксолин 	ББР (рН 2,0)	РКЭ	АДИККВВ	0,0002 – 0,06	0,00005	Лекарства, сыворотка	[126]
Противо-опухолевое	Флутамид 	ФБР (рН 7,0)	УЭ@ПП	ДИП	20–160	0,055/0,185	Лекарства	[127]
Антианги-нальное	Никорандил 	ББР (рН 12,0)	СУЭ	КВВ	12,5–62,5	22,0/72,6	Лекарства	[128]

Продолжение таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Седативное	Флунитразепам 	ФБР (рН 7,0)	СУЭ@ глюкозоок- сидаза и капли гидрогеля глюкозы	ДИП	0,31–3,1	0,22	Питьевые продукты (в т. ч. алко- гольные)	[129]
		ФБР (рН 3,0)	СУЭ@ нанокомпозит TiO2@CuO- N-rGO/poly (L-Cys)	ДИП	0,00031–15,6	0,0001	Питьевые продукты, сыворотка	[130]
		ББР (рН 8,0)	УЭ@ MnFe2O4/част ицы Au	ДИП	0,03–31,30	0,0001	Наркотики	[131]
	Клоназепам 	ФБР (рН 7,0)	Предвари- тельно об- работанный K2S2O8 СУЭ	АДИККВВ	0,0250–1,50	0,02/0,07	Питьевые продукты (в т. ч. алко- гольные)	[132]
Примечание – Обозначения: АБР– ацетатный буферный раствор; ФБР – фосфатный буферный раствор;– Робинсона; АДИККВВ – адсорбционная инверсионная квадратно-волновая вольтамперометрия; РКЭ – ртутный капающий электрод; УЭ – электрод из углеродной пасты; @ – модификация/покрытие; МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки; β – циклодекстрином (МУНТ/β-CD); ПП – Полимерная пленка								

1.2.2 Различия в методиках вольтамперометрического определения структурных аналогов

На данный момент времени не представлено однозначного мнения о применимости одинаковых режимов и их параметров для вольтамперометрического определения структурных аналогов. Некоторые авторы придерживаются позиции использования одинаковых характеристик, другие же осуществляют индивидуальный подбор.

Один и тот же режим (адсорбционная инверсионная вольтамперометрия) и его параметры (время накопления – 60 с, потенциал накопления равен $-0,6$ В, скорость сканирования – 300 мВ/с, частота – 10 Гц, шаг потенциала – 250 мВ) использовались для вольтамперометрического определения структурных аналогов ациклонуклеозида, различающихся только в увеличении алкильного фрагмента или введении дополнительных гидроксильных групп, на РКЭ. Предполагается, что возникающий катодный ток связан с восстановлением экзоциклической азометиновой группы ($-N=CH-$). По-видимому, наличие иных заместителей не влияет на процесс электровосстановления $-N=CH-$ связи. Поэтому форма пиков исследуемых соединений существенно не зависит от изменений параметров режима [133]. Позицию применения одинакового режима и его параметров поддерживают авторы [134] при вольтамперометрическом определении ванилил- и гомо-миндальных кислот, являющихся метаболитами катехоламинов, в ДИП-режиме на платиновых электродах и ТУЭ. При сравнении параметров для вольтамперометрического определения соединений из класса ароматических амидов сульфониловых кислот (сульфаниламида и сульфадиазина натрия) на немодифицированном СУЭ в растворе ББР (рН 2,0) видно, что данные вещества регистрируют в КвВ режиме и практически при близких параметрах частот (70 и 60 Гц соответственно), амплитуде импульса (50 и 40 мВ соответственно) и шаге (4 и 5 мВ соответственно) [135, 136].

Другие же авторы при аналитическом определении структурных аналогов из ряда имидазолов, содержащие нитрогруппу, на ТУЭ в растворе ББР (рН 3,0)

используют различные режимы. В качестве рабочего режима был выбран квадратно-волновой для определения метронидазола (2-метил-5-нитроимидазол-1-этанол), и ДИП-режим для тинидазола (1-(2-этилсульфонилэтил)-2-метил-5-нитроимидазол) [137, 138]. Родственная структура данным соединениям – Орнидазол – был вольтамперометрически определен на РКЭ с применением дифференциально-импульсной адсорбционной инверсионной вольтамперометрии в качестве рабочего режима [117]. Определение секнидазола в таблетках было проведено методом адсорбционной инверсионной вольтамперометрии в ББР при рН 5,3 на СУЭ [139].

Вольтамперометрическое определение секнидазола, тинидазола и орнидазола было проведено в ББР рН 7,0 на СУЭ при одних и тех же параметрах в ДИП-режиме [118]. При сравнении получившихся ДИП ВА видно, что форма пиков у каждого соединения своя и более выраженный сигнал наблюдается у тинидазола. Анализ аналитических характеристики показал, что ПО и ПКО данного метода для каждого соединения разные и отличаются в 3 раза.

При разработке методики вольтамперометрического определения соединений из ряда нитроазолоазинов-противовирусного лекарственного препарата Триазавирин® и его аналога из ряда нитроазолоазинов (аргининиевой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидин-7-она, моногидрата) производили индивидуальный подбор характеристик. Несмотря на то, что режим регистрации (КвВ) и амплитуда импульса (50мВ) на ТУЭ одинаковые, частота и скорость развертки – разные [140, 141].

Подводя итоги, не стоит однозначно говорить о применимости одного режима с одинаковыми параметрами для вольтамперометрического определения структурных аналогов нитросодержащих соединений. Как и в случае с изучением механизма электропревращений, требуется индивидуальный подход для каждого вещества.

1.3 Постановка задачи исследования

В настоящее время в литературе представлены фрагментарные исследования о превращениях нитросоединений (в том числе ЛС), которые дают информацию не только о возможных путях электропревращений, но и о причинах возникновения биологической активности в случае ЛС. Показано, что влияние даже одного фактора может являться причиной образования короткоживущих радикалов, либо образования побочных продуктов, предположительно обуславливающих биологическое действие соединений. Исходя из этого, требуются «персональные», комплексные исследования ряда оригинальных нитросоединений, даже при том условии, что вещества являются структурными аналогами.

Сведения, полученные с использованием молекулярного докинга и динамики, не всегда информативны из-за трудности учета всех условий и процессов, что впоследствии приводит к ошибочным оценочным суждениям. При этом ЭХМИ делают возможным моделирование редокс-процессов в «мягких» условиях, приближенных к организму человека. Ожидается, что информация, полученная в процессе изучения окислительно-восстановительных реакций с применением ЭХМИ в совокупности с ЭПР-спектроскопией, ВЭЖХ, МСВР и квантовыми расчетами, будет с высокой степенью вероятности коррелировать с данными, полученными в ходе биологических испытаний. Это, в свою очередь, позволит приблизиться к пониманию механизма действия потенциальных лекарственных средств, осуществлять поиск молекул-кандидатов в ЛС и направленный синтез соединений с ценными биологическими характеристиками. Таким образом, объединение цифровых технологий и инструментальных методов в рамках исследований превращений даст информацию о всестороннем понимании возможного механизма путей метаболизма потенциальных фармацевтических соединений.

С другой стороны, такой подход позволит разрабатывать методики количественного определения не для всего множества соединений, а только для потенциально биологически активных, которые впоследствии могут стать

основой веществ медицинского назначения. Учитывая, что выход ЛС на аптечную полку невозможен без контроля качества, то владение информацией об электропревращении потенциальных ЛС будет полезным при разработке простых, чувствительных и экспрессных методик вольтамперометрического определения для получения оптимального аналитического сигнала.

Таким образом, совокупность полученной информации может служить фундаментом для разработки подхода к комплексному исследованию превращений веществ, который, на данный момент времени, практически не освещен в литературе. Такой подход позволит на первых этапах создания ЛС выделить «соединения – лидеры», что, в свою очередь, поможет существенно сократить как временные, так и финансовые затраты, а также разработать методики количественного анализа для создания фармацевтических статей. Поэтому, **целью диссертационной работы** является разработка комплексного подхода для исследования структурных аналогов Триазавирина® – натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Bu**) и натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда моногидрата (**TZV-ОН**) с применением инструментальных и расчетных методов, а также методик вольтамперометрического определения выбранных перспективных соединений.

ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Объекты исследования

Натриевая соль 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины моногидрата (**TZV-OH**); натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины дигидрата (**TZV**), натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины дигидрата (**Et**); натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины дигидрата (**Pr**); натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины дигидрата (**Bu**); 3-нитро-4-оксо-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (**I**); 3-нитро-4-гидрокси-7-этилтио-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (**II**), 3-этоксикарбонил-4-гидрокси-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (**III**); 3-бromo-4-оксо-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (**Br**) (рисунок 2.1) были синтезированы сотрудниками кафедры органической и бимолекулярной химии Уральского федерального университета. Структуру соединений подтверждали методами ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии и элементного анализа [142–146].

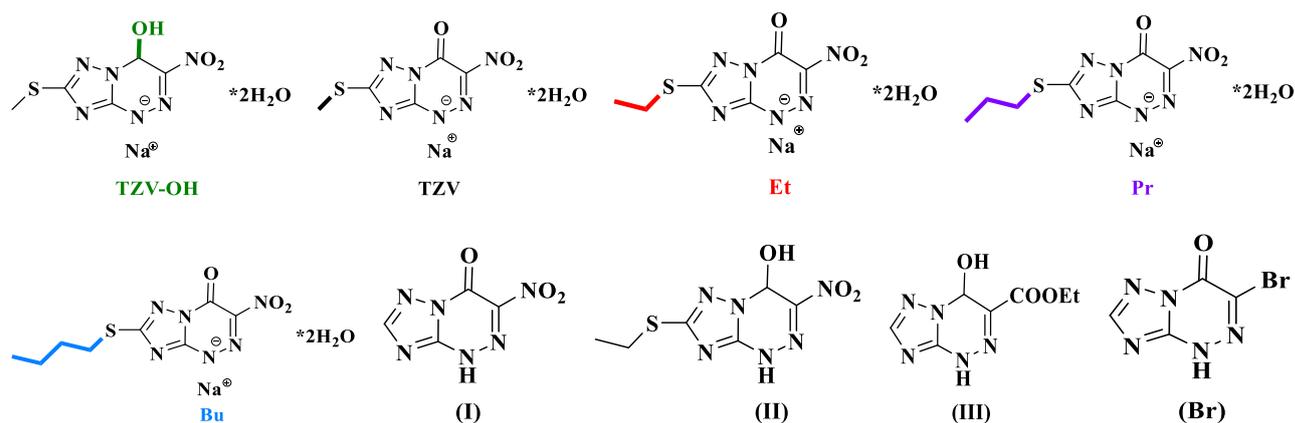


Рисунок 2.1 – Структурные формулы соединений **TZV-OH**, **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu**, **Br**, **I-III**

2.2 Оборудования и средства измерения

Аналитические весы японской марки Shimadzu AUX220 1-го класса точности (Shimadzu, Япония) использовались для взвешивания навесок.

Электрохимические измерения циклической вольтамперометрии (ЦВА) и хроноамперометрии (ХА), вольтамперометрии (ВА) в различных режимах (линейной, квадратно-волновой, дифференциально-импульсной) выполнялись с использованием потенциостата / гальваностата μ Autolab Type III (Metrohm, Швейцария) в комплекте с программным обеспечением Nova 1.11 и электрохимической трехэлектродной ячейкой для анализа, в состав которой входит:

- стеклянная измерительная емкость марки Metrohm (kit 6.1456.210, Швейцария);

- рабочие электроды – стеклоуглеродные диски (диаметром 2 и 3 мм²) производства (Metrohm, Швейцария). Полировка поверхности стеклоуглеродных электродов производилась с применением набор kit 6.2802.010 (Metrohm, Швейцария), включающего оксид алюминия с дисперсностью частиц 0,3 мкм и тканевую подложку;

- электрод вспомогательный – стержень из стеклоуглерода (Metrohm, Швейцария);

- электроды сравнения – в водных растворах использовался хлоридсеребряный электрод Ag/AgCl/KCl_{sat} (Metrohm, Швейцария). Потенциалы рабочего электрода в апротонном растворителе ДМФА измерены и приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения с двумя мембранами Ag/AgCl/KCl_{sat} (внутренняя часть электрода заполнена 0,1 моль/дм³ водным раствором KCl, внешняя – 0,1 моль/дм³ Bu₄NBF₄).

Перед каждым измерением в течение 10 мин растворы продували аргоном (чистота 99,9 %).

Измерения pH проводили на иономере pH-метр-милливольтметр типа pH-410 (производитель – Россия), оснащенным стеклянным электродом типа ЭСК-10601/7 и термопарой.

В работе также использовались дозаторы типа LLg Micropipette 1–10 мкл, 10–100 мкл и 100–1000 мкл с комплектами наконечников.

Циркуляционный жидкостный термостат марки LOIP LT-108a российского производства, соединенный со стеклянной ячейкой с термостатической рубашкой марки Metrohm (kit 6.1418.150, Швейцария), использовался для создания и поддержания температуры (30, 40, 50, 60, 70 °C) в растворе.

ЭПР-спектрометр Bruker Elexsys E 500 (Германия) применялся для регистрации спектров.

2.3 Реактивы

Исследования в водной среде проводились с применением буферных растворов Бриттона – Робинсона, которые готовили согласно рекомендациям [147]. Необходимое значение pH ББР достигалось путем добавления 2 моль/дм³ раствора гидроксида натрия. Кислоты (азотная, серная, соляная, борная, фосфорная, уксусная) и соли (сульфит натрия) марки «х. ч.» от производителей РФ «Химреактивснаб» без дополнительной очистки. Деионизированную воду, полученную на установке ДВС-М/1НА(18)-N от «Медиана фильтр», Россия, применяли для приготовления растворов. Растворитель ДМФА «х. ч.» от производителей РФ «Экос 1» с предварительной перегонкой [148] в присутствии наносит применялся для проведения экспериментов в апротонной среде. В качестве сопутствующего электролита в апротонной среде использовали тетрабутиламмония тетрафторборат (Bu₄NBF₄) «о. с. ч.» от производителей Sigma-Aldrich (США).

Спиновый зонд N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид гидрохлорид (НИОХ СО РАН, Новосибирск, РФ) [149,150] и спиновая ловушка 3,5,5-диметил-1-пирролин N-оксид [151] (Sigma Aldrich, CAS

number 3317-61-1, США) применялся для установления наличия и структуры радикала.

2.4 Электрохимические исследования

Циклические вольтамперограммы в присутствии исследуемых соединений регистрировали в диапазоне потенциалов от 0,0 до $-1,5$ В в ББР в различных рН при скорости сканирования потенциалов $0,1$ В/с.

Линейные вольтамперограммы, квадратно-волновые и дифференциально-импульсные вольтамперограммы регистрировались в рабочих условиях для каждого вещества с подобранными параметрами в ББР при рН 2 и 7.

При расчете величины тока восстановления и площади под пиком веществ использовали функцию “base line correction”, “peak search” в программе NOVA 1.11.

В процессе разработки методик количественного определения исследуемых веществ готовили рабочий раствор с концентрацией 5 г/дм³ путем растворения навески соединения чистотой $99,8$ % ($m = 0,005$ г) в 1 см³ ББР в пробирке Эппендорфа и хранили в темноте при комнатной температуре.

Перед проведением регистрации ВА производили процедуру удаления растворенного кислорода двумя способами: или физически – продувка инертным газом аргоном, или химически – добавлением в ячейку с фоновым электролитом, объем которой составляет 10 мл, $0,4$ мл 1 моль/дм³ Na_2SO_3 .

2.5 Проведение препаративного электролиза

Препаративный электролиз исследуемых соединений осуществлялся в двухэлектродной ячейке открытого типа с анодным и катодным отделениями, разделенными катионообменной мембраной. Католит – раствор ББР, рН $1,8$ – $2,2$, анолит – 15 % H_2SO_4 . Стеклоуглеродный стакан с изолирующей подставкой был использован в качестве катода (площадь рабочей поверхности $\approx 43,2$ см²). Анод – графитовый стержень с геометрической площадью рабочей поверхности $\approx 85,3$ см².

Катодит перемешивали магнитной мешалкой и продували аргоном. Электролиз проводили в гальваностатическом режиме при плотности тока 1 mA/cm^2 . Полноту протекания реакции контролировали электроаналитическими методами. Через раствор пропустили 4 Ф/моль , конверсия 87% . Осадок, выпавший во время электролиза и в результате охлаждения катодита, промывали деионизированной водой, растворяли в ацетоне и досуха высушивали под вакуумом.

2.6 Регистрация ЭПР-спектров

Регистрация ЭПР-спектров проводилась с использованием ЭПР-спектрометра Bruker Elexsys E 500 (Германия) с резонатором ER4122SHQE при комнатной температуре и следующих настройках ЭПР-спектрометра: амплитуда модуляции – 6 Гс , разрешение – 1024 точки, центр поля – 3505 Гс , ширина сканирования – 100 Гс , частота – $9,866 \text{ ГГц}$, для каждого образца в среднем 3 сканирования.

Электрохимическое генерирование продуктов восстановления исследуемых соединений с концентрацией $0,002 \text{ моль/дм}^3$ проводили в ББР ($\text{pH} = 7,0$) и в ДМФА с добавлением спинового зонда ТМТН $0,002 \text{ моль/дм}^3$ при потенциале после первого пика восстановления в течение 15 минут с интервалами в 5 минут, начиная с нулевой точки без наложения потенциала. После указанных промежутков времени аликвоту раствора отбирали и регистрировали ЭПР-спектр. Аналогичным образом проводили генерацию продуктов при том же потенциале восстановления в фоновом растворе без добавления исследуемых соединений с целью контроля количества возникающих парамагнитных центров. Аликвоты отбирали после $0, 5, 10$ и 15 минут электровосстановления вещества и регистрировали ЭПР-спектр. Перед каждым экспериментом электрохимическую ячейку продували потоком аргона.

Аналогичная последовательность действий была использована при регистрации ЭПР-спектров аддуктов взаимодействия $0,02 \text{ моль/дм}^3$ спиновой ловушки ДМРО с продуктом электрохимического генерирования $0,2 \text{ моль/дм}^3$

исследуемых соединений в течение 28 минут с интервалами 6–8 минут, начиная с нулевой точки без наложения потенциала.

2.7 Проведение квантово-химического моделирования

Квантово-химические расчеты были выполнены в ORCA ver. 5.0.3 [152, 153] с использованием метода теории функционала плотности гибридного функционала B3LYP в тройном-зета базисе с двумя поляризационными функциями def2-TZVPP с поправкой атомно-парной дисперсии со схемой Бекке – Джонсона (D3BJ) и критерия сходимости TightSCF. Оптимизация геометрии с использованием критерия TightOpt производилась с целью поиска стационарных точек потенциальной энергии. Расчеты частот колебаний использовались для получения термодинамических величин и проверки, что все найденные стационарные точки являются локальными минимумами. Симуляцию и визуализацию расчетных ЭПР-спектров выполняли в модуле EasySpin 5.2.35 [154] программного пакета MATLAB.

2.8 Изготовление толсто пленочных углеродсодержащих электродов

При разработке методики вольтамперометрического определения в качестве рабочего электрода использовали толсто пленочные углеродсодержащие электроды (ТУЭ) на основе чернил либо Electrodag PF-407 производства Henkel Adhesive Technologies (Германия); либо Carbon Paste и Carbon Paste (Heavy Metal Detection) чернила производителя SunChemical (Великобритания). ТУЭ были изготовлены в лабораторных условиях на машине для трафаретной печати ТИС-50В (Китай). Углеродсодержащие чернила наносились на полимерную подложку толщиной 0,035 см в виде полос размером 0,2×3,8 см слоем толщиной около 40 мкм. Полоски прошли термообработку в сушильном шкафу в соответствии с регламентом производителя краски и изолирование.

ГЛАВА 3 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ

3-НИТРО-4-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА МОНОГИДРАТА

3.1 Электрохимическое поведение натриевой соли

3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда моногидрата

Исследование электропревращений соединений из ряда 3-*R*-4-оксо(гидрокси)-1,4-дигидро-7-*X*-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов как содержащих (**TZV-OH**, **TZV**, **I**, **II**), так и не содержащих (**III**) нитрогруппу было проведено методом циклической вольтамперометрии в водной среде при pH 2,0 ± 0,1 (рисунок 3.1).

Соединения **TZV-OH**, **TZV**, **I** и **II**, содержащие в своей структуре нитрогруппу, восстанавливаются необратимо, для соединений **TZV-OH** и **II** в одну стадию, и этот пик является единственным до потенциала разряда фона, а для соединений **TZV** и **I** – в две последовательные стадии. Различие электрохимического поведения **TZV-OH** и **II** от **TZV** и **I** связано, вероятно, с заменой оксо-группы на гидроксильный фрагмент в 4 положении шестичленного кольца гетероцикла. Стоит отметить, что первый пик восстановления у всех четырех соединений (**TZV-OH**, **TZV**, **I** и **II**) находится в диапазоне потенциалов от –0,23 до –0,3 В, что сопоставимо с потенциалами гетероциклических нитросоединений [5, 6, 8, 18, 22, 23]. Соединение **III**, содержащее в своей структуре вместо нитрогруппы этоксикарбонильный фрагмент, восстанавливается в один пик и при более отрицательных потенциалах (–0,99 В). Таким образом, можно предположить, что редокс- превращения исследуемых соединений **TZV-OH**, **TZV**, **I** и **II** соответствует электровосстановлению нитрогруппы.

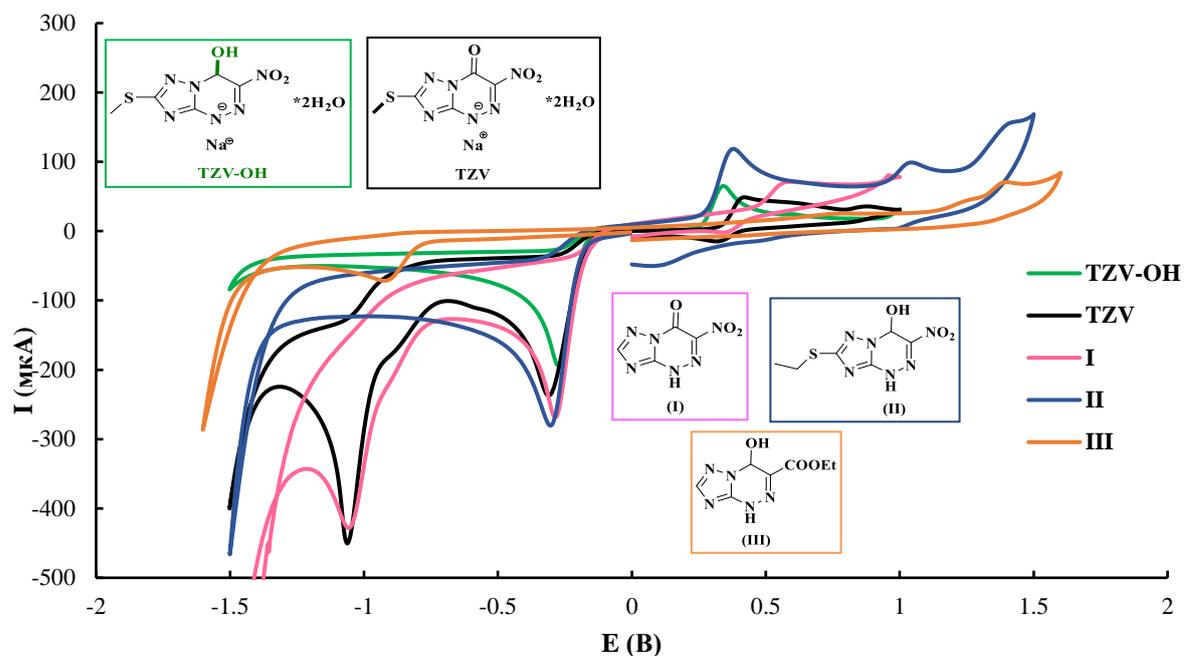


Рисунок 3.1 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на СУЭ в растворе ББР (рН 2,0) с добавлением 5 ммоль/дм³ соединений **TZV-OH**, **TZV**, **I – III** при $\nu = 0,1$ В/с

Отметим, что соединения **TZV-OH** и **TZV** представляют собой соли, образованные катионом Na^+ и гетероциклическим анионом, поэтому их восстановление должно было бы протекать при более отрицательных значениях потенциала по сравнению с соединениями **I** и **II**. Вероятнее всего, различие в величинах токов восстановления соединения **TZV-OH** и **TZV** с **I** и **II** также связаны с влиянием ионов Na^+ , содержащихся в структурах соединений **TZV-OH** и **TZV**. Можно предположить, что сходство электрохимического поведения соединений **TZV-OH**, **TZV**, **I** и **II** в растворах при рН 2,0 свидетельствует о первоначальном протонировании гетероциклических анионов соединений **TZV-OH** и **TZV** и дальнейшем восстановлении на электроде не гетероциклического аниона, а соответствующей протонированной частицы. Для подтверждения предположения об участии протонов в электрохимическом восстановлении соединения **TZV-OH** было проведено исследование в неводной среде – ДМФА [155] (рисунок 3.2).

На вольтамперограммах (ВА), зарегистрированных в апротонном растворителе, потенциал первого пика электрохимического восстановления

соединения **TZV-OH** имеет значение на 800 мВ отрицательнее, чем для соединения **II**. Это можно объяснить отрицательным зарядом восстанавливающихся частиц в случае соединения **TZV-OH**. При добавлении раствора щелочи гидроксида натрия к раствору соединения **II** в ДМФА наблюдается существенное изменение ВА: наблюдается увеличение величин катодных и анодных токов, пики окисления/восстановления сдвигаются в катодную область, однако система остается необратимой [155] (рисунок 3.2).

Для того чтобы исключить влияние воды, добавляемой вместе с щелочью к раствору соединения **II** в ДМФА, были зарегистрированы ЦВА соединения **TZV-OH** с добавлением 0,5 ммоль/дм³ H₂O (рисунок 3.2). Можно отметить, что не только значения потенциалов пиков восстановления соединения **TZV-OH** с добавлением воды и соединения **II** с добавлением водной щелочи совпадают, но и вид их ЦВА. Анодные пики **TZV-OH** и **II** на реверсивной части ВА несколько отличаются по значению потенциала, что, вероятно, связано с влиянием дополнительной группы CH₃- в тиольном заместителе. Следовательно, можно полагать, что **TZV-OH** в апротонной среде восстанавливается в ионном виде, вероятнее всего, в виде ионной пары с катионом Na⁺, а в водной среде – в виде протонированной частицы [155].

Известно [159], что реакция восстановления нитрогруппы сопровождается предшествующей протонизацией. Поэтому влияние pH растворов ББР на величину тока и значения потенциалов восстановления соединения **TZV-OH** исследовали в диапазонах pH от 2,0 до 11,0. Из рисунка 3.3 (а) следует, что увеличение pH практически не влияет на величину тока. Более того, величина тока незначительно отличается от теоретического рассчитанного уровня тока по уравнению Рендлса – Шевчика для необратимых систем с участием 3-х электронов [157].

При этом изменение pH среды существенно влияет на потенциал электровосстановления соединения **TZV-OH** и смещает его в катодную область на 400 мВ (рисунок 3.3, б). В соответствии с уравнением (7) наблюдается линейная зависимость между значением потенциала катодного пика соединения **TZV-OH**

и рН ББР (рисунок 3.3, б), наклон из которой (50,8 мВ/рН) близок к теоретическому значению Нернста (59 мВ/рН).

$$E = -(0,0508 \pm 0,0007) pH - (0,154 \pm 0,05) \quad (R^2 = 0,9987). \quad (7)$$

Отношение между числом протонов (m) и электронов (z), участвующими в реакции, составило 0,86, что указывает на эквивалентное количество протонов и электронов, участвующих в электровосстановлении [158–160].

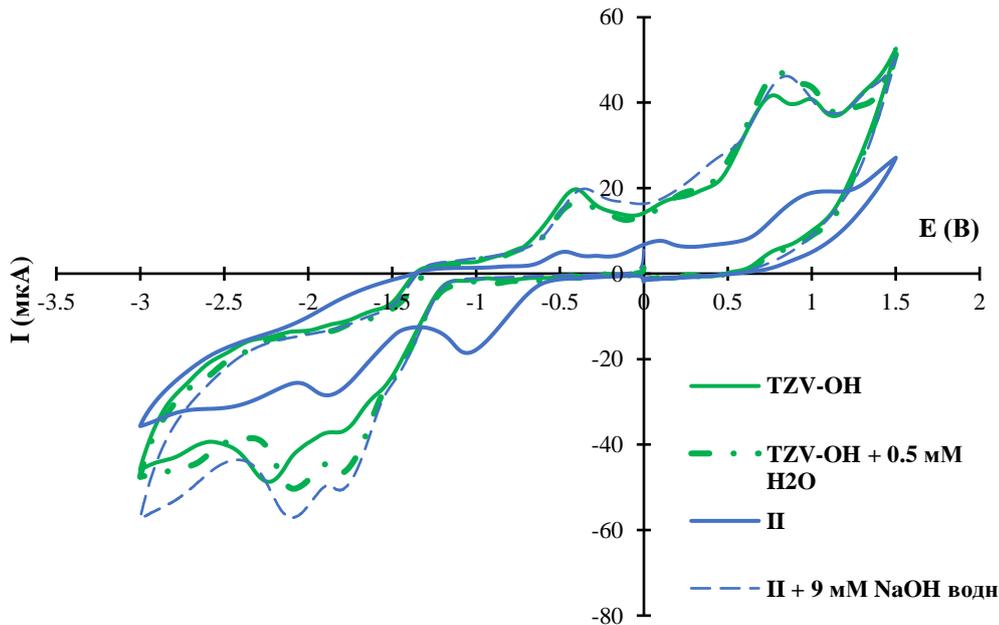


Рисунок 3.2 – ЦВА соединений (5 ммоль/дм^3) в ДМФА ($0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ Вu}_4\text{NBF}_4$), зарегистрированные на СУЭ с $\nu = 0,1$, В/с: зеленая – **TZV-OH**, зеленая пунктир – **TZV-OH** с добавлением $0,5 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ H}_2\text{O}$, синяя – **II**, синяя пунктир – **II** с добавлением 9 ммоль/дм^3 водного NaOH

На основании вышесказанного можно предположить, что с увеличением рН среды электровосстановление **TZV-OH** затруднено вследствие нехватки протонов как для предшествующего протонирования, так и для протонирования промежуточных продуктов электрохимической реакции [18]. Поскольку величина катодного тока не зависит от рН, а зависимость E от рН линейна, можно предположить, что электровосстановление соединения **TZV-OH** во всей области рН происходит по одному механизму. Для дальнейших исследований ББР при рН $2,0 \pm 0,1$ был применен, поскольку при этом рН потенциал пика максимально

сдвинут в анодную область, что позволяет исследовать электропревращения без конкурирующей реакции восстановления водорода на электроде.

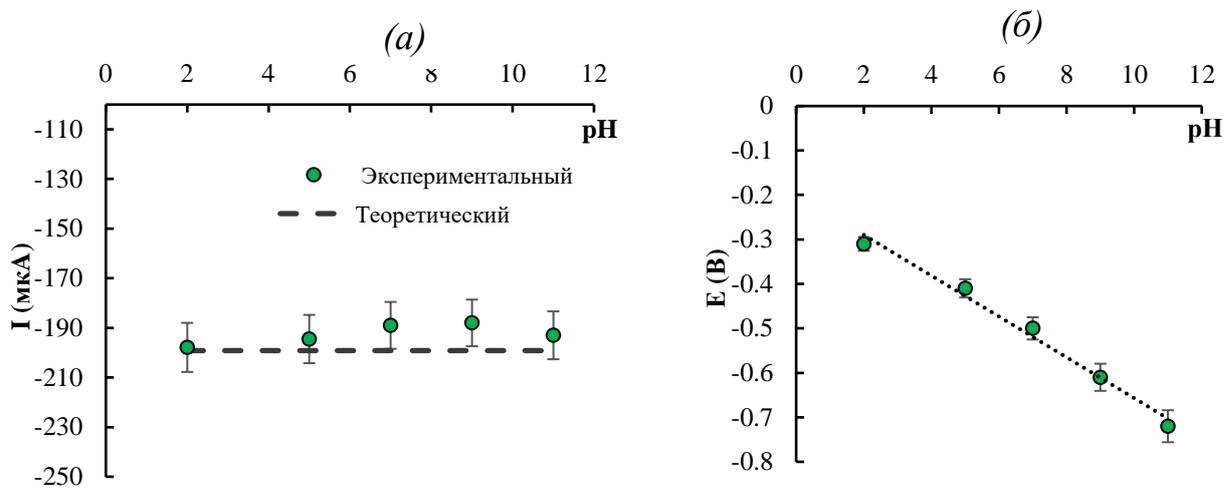


Рисунок 3.3 –Зависимость величины тока первого пика восстановления (а) и значения его потенциала (б) от рН среды для 5 ммоль/дм³ соединения **TZV-OH**

Согласно литературным данным [156], лимитирующей стадией в процессе электровосстановления нитроароматических соединений является диффузия, осложненная предшествующей химической реакцией протонирования аниона. Поэтому были проведены исследования по изучению кинетики электрохимического процесса. Критерий Семерано, рассчитанный из логарифмической зависимости величины тока от скорости наложения потенциала ($tg = \lg I_p / \lg v$), равен 0,51 (рисунок 3.4, а). Линейная зависимость тока первой стадии от концентрации (8) в диапазоне от 0,25 до 1,75 ммоль/дм³ дает основания полагать, что электровосстановление соединения **TZV-OH** в кислых средах не осложняется реакциями второго порядка.

$$\ln I = (1,00 \pm 0,01) C + (2,98 \pm 0,02) \quad (R^2 = 0,98). \quad (8)$$

Эти предположения, а также линейная зависимость тока пика от квадратного корня из скорости наложения потенциала (рисунок 3.4, б) могут свидетельствовать о диффузионном контроле электрохимического процесса [161].

Температурно-кинетический метод, представленный на рисунке 3.5 [169], был

применен для подтверждения предположения о диффузионном- контролируемом процессе электровосстановления **TZV-ОН**.

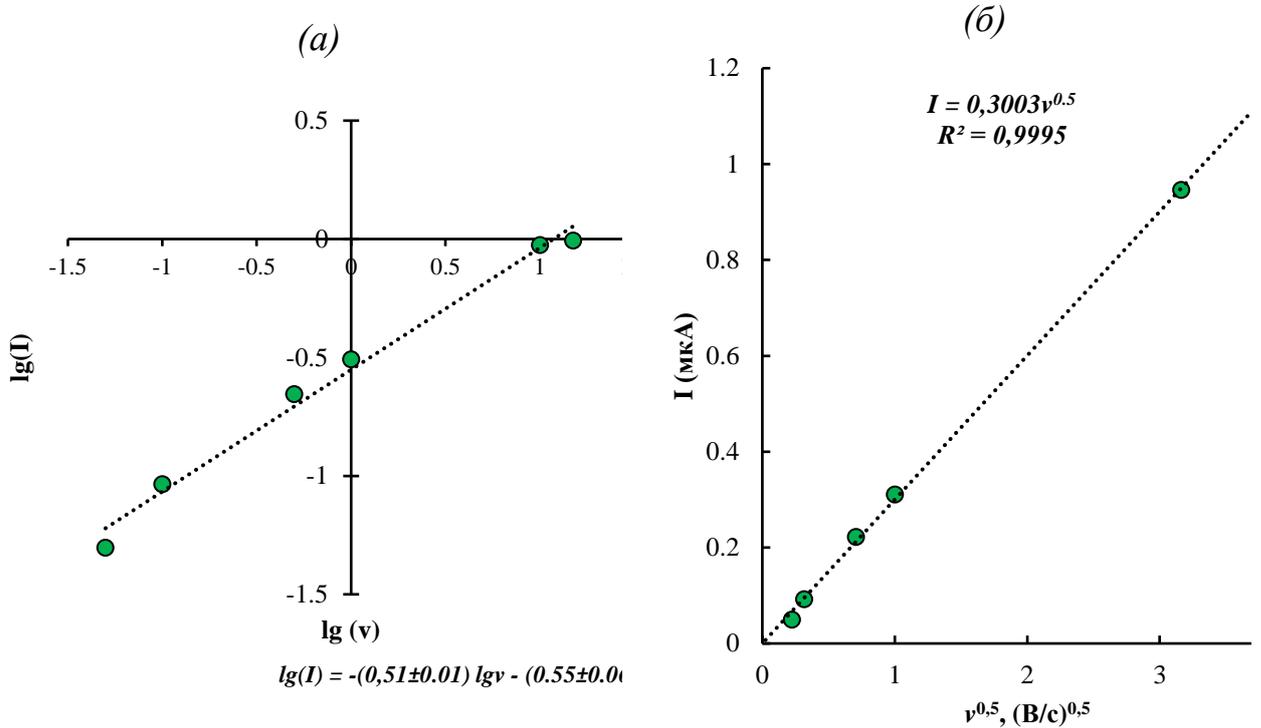


Рисунок 3.4 – Логарифмическая зависимость величины тока от скорости наложения потенциала (а) и зависимость тока пика от квадратного корня из скорости наложения потенциала (б) **TZV-ОН** в ББР $\text{pH}=2,0 \pm 0,1$ на СУЭ

Как видно из рисунка 3.5 (а), значение $\Delta E_k = 0,04$ В соединения **TZV-ОН** в диапазоне от 20 до 70 °С лежит в рамках допустимых значений для использования данного метода при расчете энергии активации и коэффициента переноса электронов. По данным рисунка 3.5 (б) была рассчитана эффективная энергия активации, равная 2,99 ккал/моль, и коэффициент переноса электрона (α), равный 0,37. Полученная энергия активации близка к значению 3 ккал/моль, следовательно, причиной перенапряжения, как и упоминалось ранее, вероятно, является замедленная стадия диффузии [162, 163].

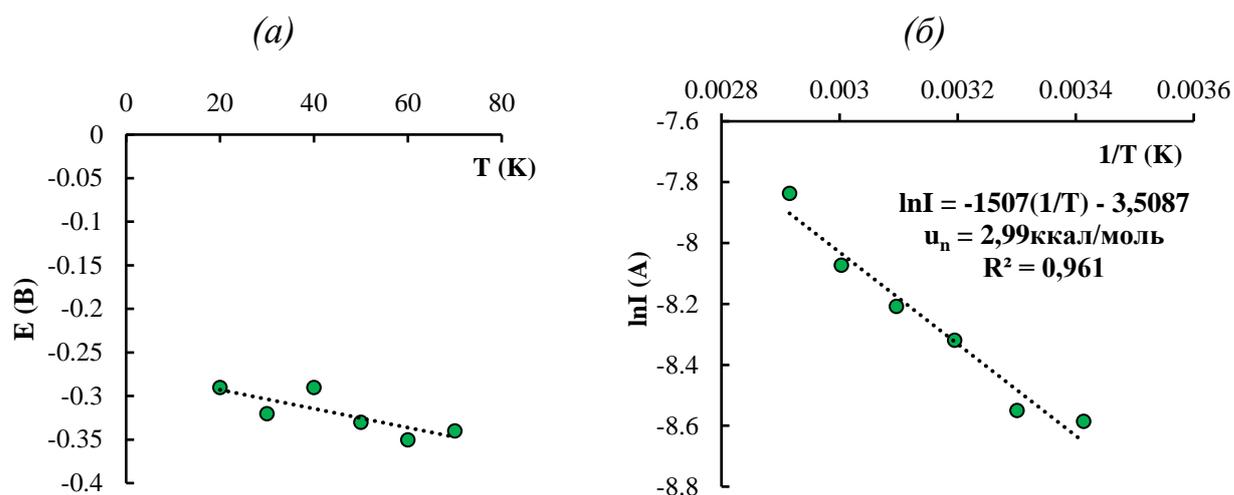


Рисунок 3.5 – Зависимость потенциала пика восстановления соединения **TZV-OH** от температуры раствора (а) и натурального логарифма величины тока от температуры (б) с приведенным расчетом энергии активации электрохимической реакции восстановления соединения **TZV-OH** при $\text{pH } 2,0 \pm 0,1$

Расчет эффективного числа электронов n_e , участвующих в электрохимической реакции электровосстановления **TZV-OH**, был произведен четырьмя параллельными способами (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Средние значения рассчитанного числа электронов n_e , участвующих в электровосстановлении соединения **TZV-OH** ($C = 5$ ммоль/дм³) в водном буферном растворе БР при $\text{pH } 2,0$, определенные методами ЦВА, ХА

Соединение	n_e^1	n_e^2	n_e^3	n_e^4 (ХА)
TZV-OH	2,98	3,10	3,5	3,07
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1	1	1	1,02

Примечание: n_e^1 – количество электронов, полученное отношением количества электричества вещества с количеством электричества модельной редокс-пары $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ в тех же самых условиях; n_e^2 – количество электронов, полученное отношением величины тока вещества с величиной тока модельной редокс-пары $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ в тех же самых условиях; n_e^3 – количество электронов, полученное по уравнению Рендлса – Шевчика для необратимых систем, учитывая, что $\alpha = 0,37$ [157]; n_e^4 – по уравнению Коттрелла, принимая во внимание, что значение коэффициента диффузии для нитроароматических соединений в водных средах близко к 10^{-5} см²/с [164]

Как видно из таблицы 3.1, значение эффективного числа электронов, участвующих в электровосстановлении **TZV-OH** и рассчитанных по сравнению

величин токов и количества электричества модельной редокс-пары $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ и по уравнению Коттрела, приближается к величине 3. При этом число электронов, полученное по уравнению Ренделса – Шевчика для необратимых систем с учетом рассчитанного ранее коэффициента переноса электронов ($\alpha = 0,37$), приближается к значению 4, что согласуется с классической схемой электровосстановления нитросоединений и тем самым может являться приближенным к истинному.

Таким образом, электровосстановление соединения **TZV-OH** протекает необратимо в одну четырехэлектронную стадию за счет восстановления нитрогруппы.

3.2 Сравнительная характеристика процессов электровосстановления натриевой соли

**3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазирида
моногидрата и натриевой соли**

**3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазирида
дигидрата**

Несмотря на структурную схожесть соединений **TZV-OH** и **TZV**, наблюдаются различия в электровосстановлении данных соединений. Электровосстановление нитрогруппы соединения **TZV-OH** является одноволновым и лимитируется только диффузией в отличие от соединения **TZV**, в котором процесс протекает в 2 ступени с присоединением 4-х и 2-х электронов соответственно, а также лимитируется диффузией, осложненной предшествующей химической реакцией. Электровосстановление нитрогруппы соединения **TZV-OH** остается схожим в диапазоне рН от 2 до 11 в отличие от соединения **TZV**, у которого наблюдается различие в кинетике электродных реакции в кислой, нейтральной и щелочной средах.

Однако первая стадия у соединений **TZV-OH** и **TZV** протекает при близких электродных потенциалах в водных средах, и восстановление соединений происходит в виде протонированных частиц. Кроме того, исследование

электровосстановления соединения **TZV-OH** в ДМФА показало, как в случае с **TZV**, наличие обратимого пика окисления ($\Delta E = 95$ мВ, соотношение I_c/I_a составляет 0,8, а также соотношение величин тока и площади под пиком соединения **TZV-OH** и ферроцена в тех же условиях близко к 1), что может говорить о переносе одного электрона на ионную пару соединения **TZV-OH**, следствием которого является образование анион-радикала. Не исключено, что аналогично, как и для **TZV** [5], в присутствии щелочных металлов меняется не только скорость протонирования анион-радикалов **TZV-OH**, но и региоселективность химической реакции. Как говорилось ранее, установление наличия и природы интермедиата радикальной природы могут способствовать уточнению пути электропревращения.

3.3 Изучение продуктов электровосстановления натриевой соли

3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазирида моногидрата и натриевой соли

3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазирида дигидрата методом ЭПР-спектроскопии и квантово-химическими расчетами

На первом этапе были проведены ЭПР-исследования в апротонной среде (ДМФА) с целью стабилизации анион-радикала. Прямым способом зафиксировать увеличение парамагнитной активности радикальных частиц в течение электрогенерирования при потенциале после первого пика восстановления $E = -1,8$ В соединения **TZV-OH**, как и в случае соединения **TZV**, не удалось. По-видимому, это связано с неустойчивостью промежуточного продукта радикальной природы. Поэтому, предполагая наличие короткоживущих радикалов, как и в случае с **TZV** [5], была проведена регистрация ЭПР-спектров взаимодействия продуктов электровосстановления соединения **TZV-OH** с добавлением в раствор спинового зонда ТМТН, которые являются стабильными в течение десятков минут, что позволило построить зависимость количества образующихся парамагнитных частиц от времени. Отсутствие роста количества

парамагнитных частиц в холостом опыте ($N = 0,006 \tau + 0,039$) и значительный их рост ($N = 0,27\tau + 0,63$) в присутствии ТМТН во времени электрогенерирования может косвенно указывать на радикальный характер промежуточных продуктов электропревращения соединения **TZV-OH**. Схожая зависимость наблюдалась в водной среде (холостой опыт – $N = 0,005 \tau + 0,5173$; с добавлением соединения **TZV-OH** – $N = 0,52\tau + 0,90$), что также подтверждает образование интермедиатов радикальной природы соединения **TZV-OH** при его электровосстановлении. Сравнение уравнений зависимостей количества парамагнитных центров от времени электрогенерирования в апротонной и водной среде показало, что тангенс угла наклона прямой в водной среде больше (0,52), чем в апротонной (0,27). Это может дополнительно указывать на непосредственное участие протонов в процессе образования продуктов радикальной природы соединения **TZV-OH**. Подобный характер различия тангенсов угла наклона зависимостей количества парамагнитных центров от времени их генерирования наблюдается и у соединения **TZV**. Для **TZV** величина тангенса угла наклона зависимостей количества парамагнитных центров от времени их генерирования в водной среде составляет 0,29, а в апротонной – 0,12. На основании полученных результатов можно предположить, что у соединения **TZV-OH** по сравнению с соединением **TZV** образуется больше интермедиатов радикальной природы как в водных средах, так и в апротонных растворителях.

Регистрация ЭПР-спектра взаимодействия спиновой ловушки DMPO с продуктами электрохимического восстановления соединений **TZV-OH** и **TZV** в ДМФА (рисунок 3.6, а, б) была проведена для подтверждения наличия промежуточных частиц. Линейная зависимость концентрации спиновых аддуктов взаимодействия DMPO с продуктами электровосстановления соединений **TZV-OH** и **TZV** от времени также указывает на рост парамагнитных частиц во времени, что может свидетельствовать о радикальном механизме реакции электровосстановления соединения **TZV-OH** и **TZV** (рисунок 3.6, в, г). Сравнение тангенсов угла наклона зависимостей концентрации спиновых аддуктов от времени для **TZV-OH** и **TZV** дает основания предполагать, что при электровосстановлении

TZV-OH образуется больше интермедиатов радикальной природы, чем у **TZV**, что согласуется с вышесказанным предположением.

Использование термодинамических параметров в квантово-химических расчетах позволило провести моделирование путей электрохимических превращений соединения **TZV-OH** для установления вероятного строения промежуточных частиц. Различные варианты процессов восстановления и протонирования на основе схемы восстановления нитросоединений рассмотрены при моделировании возможных путей реакций [156].

На рисунках 3.7 (а, б) представлены вероятные пути электровосстановления в апротонной среде для соединений **TZV-OH** и **TZV** соответственно. Квантово-химические расчеты, проведенные для соединения **TZV-OH**, согласуются с полученными экспериментальными данными и предположением о наличии анион-радикала на анодной части вольтамперограммы при реверсе потенциала первого катодного пика. Однако наиболее энергетически выгодным является процесс последующего переноса электрона и протонирования (**TZV-OH (2)** и **TZV-OH (3)**). Карта распределения электростатического потенциала была построена для определения наиболее возможных центров протонирования дианион-радикала. Наиболее вероятными точками является нитрогруппа и атом азота в I положении шестичленного гетероциклического кольца. Из расчета изменения энергии Гиббса для соединения **TZV-OH** следует, что вероятнее всего процесс образования смеси аддуктов **TZV-OH (4)** и **TZV-OH (5)**. Зарегистрированный и смоделированный ЭПР-спектры (в соотношении аддуктов **TZV-OH (4)** и **TZV-OH (5)** как 1:2) настолько близки (RMSD = 3,7 %), что это может являться подтверждением вероятности образования данных аддуктов при восстановлении исследуемого вещества **TZV-OH** в апротонной среде в присутствии спиновой ловушки DMPO (рисунок 3.7, в).

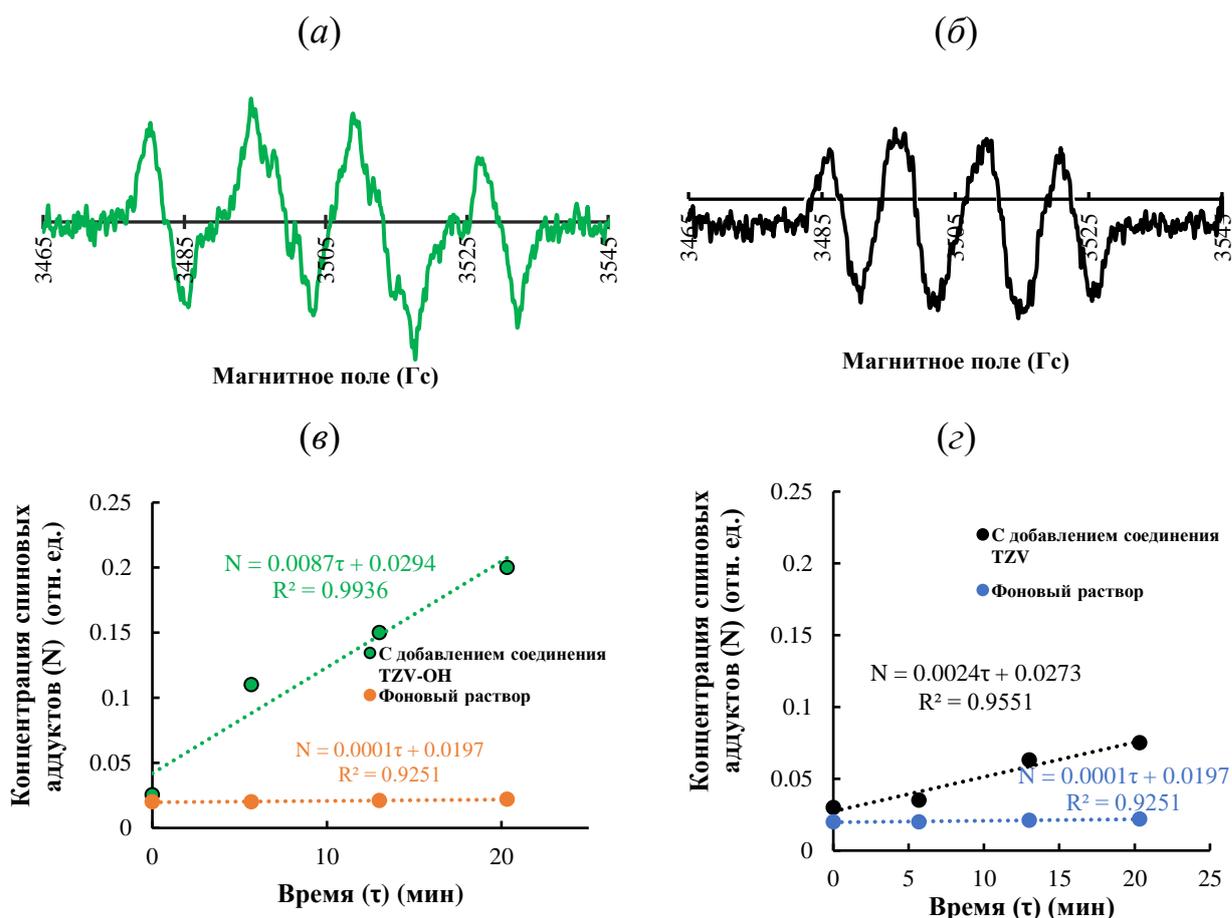


Рисунок 3.6 – Зарегистрированные ЭПР-спектры продуктов электровосстановления соединения **TZV-OH** (а) и **TZV** (б) ($C = 200$ ммоль/дм³) с добавлением спиновой ловушки DMPO ($C = 20$ ммоль/дм³) в ДМФА и зависимости концентрации аддуктов спиновой ловушки DMPO с продуктами электровосстановления соединений **TZV-OH** (в) и **TZV** (з) от времени

Квантово-химические расчеты для соединения **TZV** также согласуются с экспериментальными данными, на ВА которых есть пик окисления на анодной части вольтамперограммы при реверсе потенциала первого пика, что указывает на наличие анион-радикала [5]. Однако, как и в случае соединения **TZV-OH**, наиболее выгодным является последующий перенос электрона и стадия протонирования дианион-радикала. По данным карты распределения электростатического потенциала наиболее вероятными точками протонирования является нитрогруппа, что согласуется с проведенными квантово-химическими расчетами ($\Delta G = -12,29$ эВ и $\Delta G = -12,72$ эВ) и атом азота в I положении шестичленного кольца гетероцикла

($\Delta G = -12,70$ эВ). Следующей возможной стадией является взаимодействие с ДМРО с образованием **TZV (2)** интермедиата. Также вероятен процесс дополнительного протонирования и взаимодействия между спиновой ловушкой ДМРО с продуктом электровосстановления соединения **TZV** и образованием аддуктов **TZV (3)** и **TZV (4)**. Экспериментально полученные и смоделированные ЭПР-спектры, приведенные для соотношения аддуктов **TZV (2): TZV (3): TZV (4)** как 3 : 1 : 0.33, настолько близки, что это свидетельствует о возможности образования данных аддуктов в смеси (рисунок 3.7, *з*)

Сравнение вероятных путей электровосстановления соединений **TZV-OH** и **TZV** позволяет отметить, что для **TZV** требуется на одну стадию протонирования больше, чем в случае соединения **TZV-OH**, что может быть связано с различием заместителей в структурах исследуемых веществ (рисунок 3.7, *а* и *б*). Ранее было выдвинуто предположение об образовании оксимов при электровосстановлении соединения **TZV** [19]. Полученные квантово-химические расчеты также указывают на их образование. В случае соединения **TZV-OH**, кислород в IV положении уже протонирован, что облегчает процесс образования аддуктов и не приводит к образованию оксимов. Косвенным подтверждением образования оксимов в процессе электровосстановления соединения **TZV** может служить резкое уменьшение величины его катодного тока в водных щелочных средах [5], в то время как у соединения **TZV-OH** ток существенно не изменяется в диапазоне рН от 2 до 12.

Поскольку ЭПР-спектры зондов и ловушек дают лишь косвенное доказательство наличия интермедиата радикальной природы, а для подтверждения наличия и идентификации промежуточных и конечных продуктов реакций был произведен препаративный электролиз с последующим установлением структуры продуктов методом МСВР.

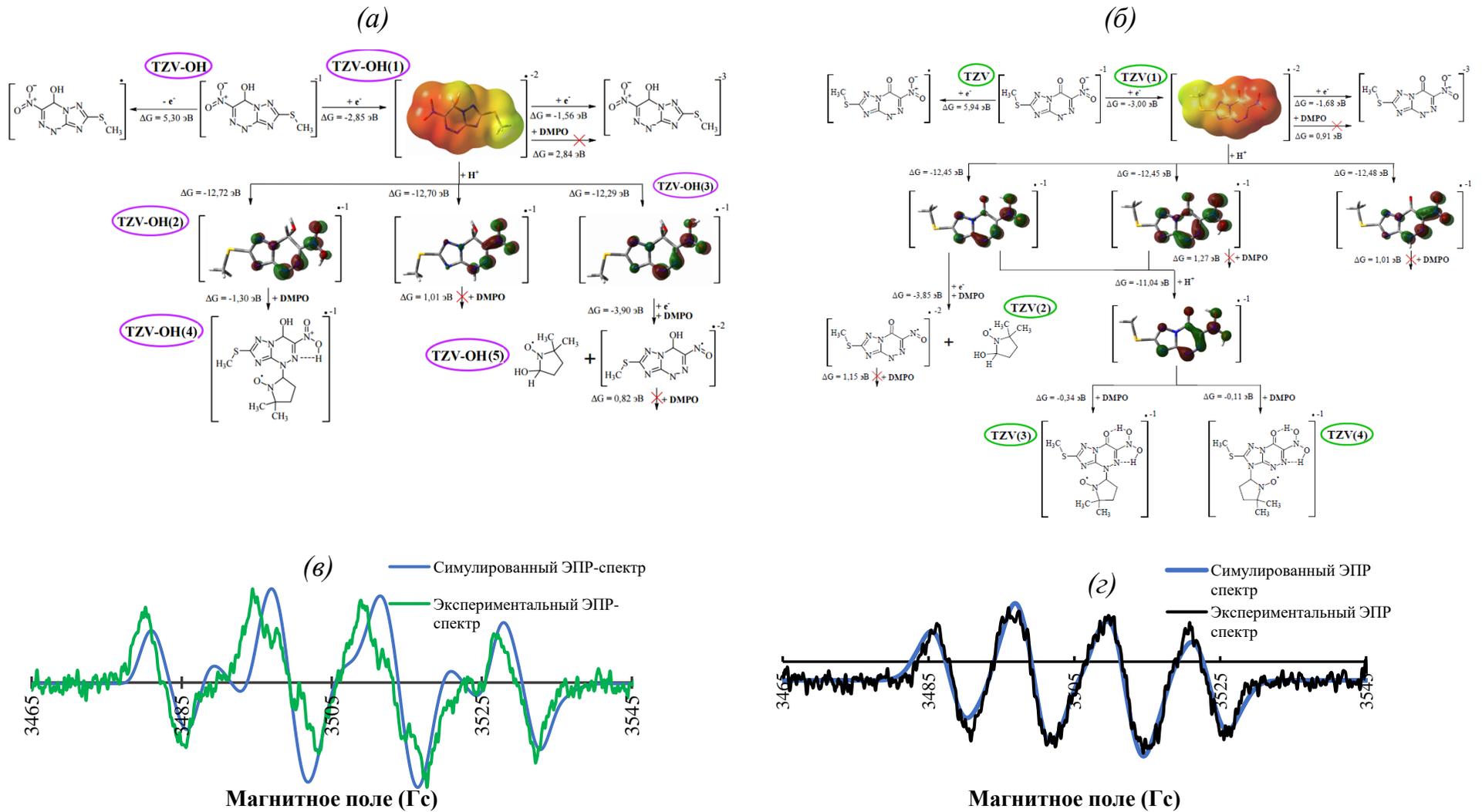


Рисунок 3.7 – Вероятный путь электровосстановления соединений **TZV-OH** (a) и **TZV** (b) в апротонной среде и зарегистрированные ЭПР-спектры аддуктов спиновой ловушки DMPO с продуктами восстановления соединения **TZV-OH** (e) и **TZV** (z) в ДМФА с совмещенными симулированными ЭПР-спектрами предполагаемых аддуктов

Результаты масс-спектра (рисунок 3.8) дают основания полагать, что продуктами реакции являются 3-гидроксиамино-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид (1.1), 3-амино-7-(метилтио)-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-4-ол (1.2) и продукт димерного строения с m/z равным 412.08 (1.3) (6-(2-гидрокси-2-(7-гидрокси-2-(метилтио)-4,7-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-6-ил)гидразинил)-2-(метилтио)-7Н-314,412-[1,2,4]триазоло[5,1-*b*]пиримидин-7-ол). Данные масс-спектра указывают на наличие продукта б-электронного присоединения. Исходя из этого, предполагается, что электровосстановление соединения **TZV-ОН** протекает в две стадии. Стоит отметить, что при проведении препаративного электролиза концентрация исходного вещества уменьшается, следствием чего является смещение пика в более катодную область, что, в свою очередь, приводит к образованию побочного продукта. Отсутствие ионов натрия в структурной формуле интермедиата еще раз подтверждает предположение, что соединение **TZV-ОН** в водных средах электропревращается в виде протонированной частицы. Образование анион-радикала также указывает на возможность образования димеров [156, 165].

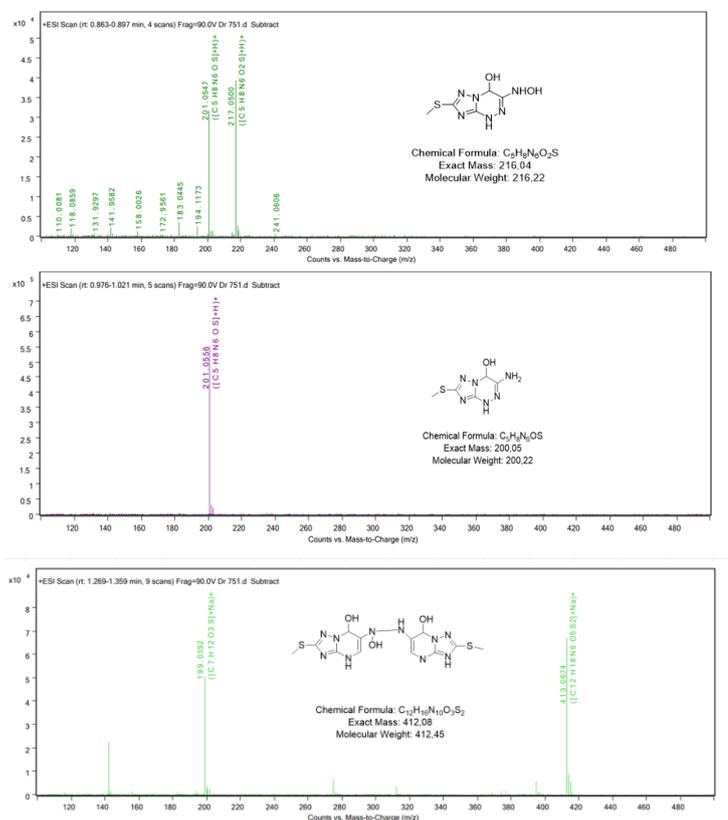


Рисунок 3.8 – Результаты МСВР-соединения **TZV-ОН** после проведения электролиза

На основании вышеизложенных экспериментальных данных и изученной литературы был предложен вероятный путь электровосстановления соединения **TZV-OH** в водных средах (рисунок 3.9).

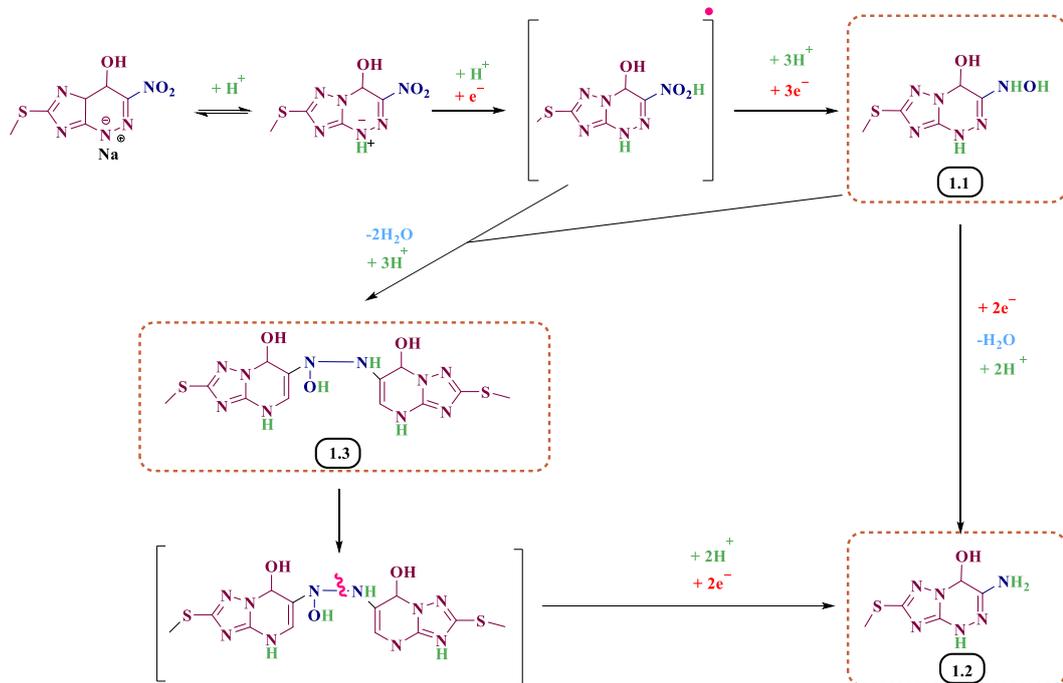


Рисунок 3.9 – Вероятная схема электровосстановления соединения **TZV-OH** в водной среде

Суммируя вышесказанное, электропревращения соединений **TZV-OH** и **TZV** протекают необратимо за счет восстановления нитрогруппы в виде протонированных частиц в водной среде, в апротонной среде в виде ионных пар с катионами натрия, через образование частиц радикальной природы. Промежуточными и конечными продуктами реакции также являются соответствующие гидроксиламины, амины и продукты конденсации.

Несмотря на структурную схожесть соединения **TZV-OH** и **TZV**, наблюдаются различия в электропревращении данных соединений. Электровосстановление нитрогруппы соединения **TZV-OH** является одноволновым и лимитируется только диффузией в отличие от соединения **TZV**, в котором процесс протекает в 2 ступени с присоединением 4-х и 2-х электронов соответственно, лимитируется диффузией, осложненной предшествующей химической реакцией. Электропревращения нитрогруппы соединения **TZV-OH**

остается схожим в диапазоне pH от 2,0 до 11,0 в отличие от соединения **TZV**, у которого наблюдается различие в кинетике электродных реакции в кислой, нейтральной и щелочной средах. Также кинетика электропревращения соединений **TZV-OH** и **TZV** отличается тем, что у соединения **TZV** есть дополнительная стадия протонирования анион-радикала, а отсутствие данной стадий у соединения **TZV-OH**, вероятно, приводит к образованию большего количества интермедиатов радикальной природы. Кроме того, одной из причин возникновения меньшего количества радикальных частиц у соединения **TZV** может являться образование оксимов. Различные заместители в структурах исследуемых соединений могут являться одной из причин в расхождении путей электропревращений соединений **TZV-OH** и **TZV**. На основании вышесказанного можно предположить, что соединение **TZV-OH** будет обладать большей биологической активностью, чем **TZV**.

TZV проявляет наибольшую эффективность действия на начальных стадиях развития болезни [166], и, возможно, у данного класса соединений основным механизмом противовирусного действия является ингибирование слияния вируса гриппа с эндосомальной мембраной инфицируемой клетки, препятствующее дальнейшему заражению клетки вирусным геномом. Поэтому представляется интересным провести анализ возможности протекания данного процесса после обработки вирусных частиц **TZV** и **TZV-OH** с использованием модельных липидных мембранам в условиях, соответствующих выходу из эндосом.

Исследования по установлению вероятности слияния вируса гриппа А (штамм A/Puerto Rico/8/34, подтип H1N1) с бислойными липидными мембранами после обработки соединениями **TZV** и **TZV-OH** показали, что обработка вирусных частиц соединением **TZV-OH** (44,1%) приводит к лучшему ингибированию процесса слияния по сравнению с **TZV** (52,9 %).

На основании вышесказанного можно сказать, что гипотеза о наибольшей биологической активности **TZV-OH** подтверждается экспериментальными результатами.

Выводы к главе 3

1. Электропревращения структурных аналогов **TZV-ОН** (3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата и натриевой соли) и 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**TZV**) протекают по разным механизмам.

2. Предполагается, что такое расхождение связано с различиями в структурах веществ, что оказывает влияние на кинетику электрохимической реакции (для **TZV-ОН** – диффузия, для **TZV** – диффузия, осложненная предшествующей химической реакцией), которая впоследствии, возможно, приведет к большему количеству интермедиатов радикальной природы у **TZV-ОН**.

3. Исследования *in vitro* показывают, что **TZV-ОН** обладает большей способностью к ингибированию вируса гриппа А, чем **TZV**. Вероятно, что наличие и количество интермедиатов являются одной из причин, обуславливающих биологическую активность, которая у **TZV-ОН** больше, чем у **TZV**.

4. Электрохимические параметры в совокупности с данными ЭПР-исследований и квантово-химическими расчетами коррелируют с биофизическими экспериментами, проводимыми в условиях моделирования мембраны клетки. Информация, полученная в ходе данной главы, может стать частью методологии комплексного исследования веществ и, как следствие, предварительной оценки потенциальной биологической активности. Кроме этого, эти данные могут оказаться значимыми при разработке методик количественного определения.

ГЛАВА 4 МЕТОДИКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ

3-НИТРО-4-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛТИО-4Н-

[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]ТРИАЗИНИДА МОНОГИДРАТА НА СТЕКЛОУГЛЕРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ

Совокупность вышеприведенного материала, описанного в главе 3, включающего описание кинетических и термодинамических параметров, и анализ литературных данных позволили разработать методику вольтамперометрического определения **TZV-ОН**. Поскольку предполагается, что механизм электропревращения **TZV-ОН** схож на всем диапазоне рН, то в качестве рабочих условий было принято выбрать рН 2,0, поскольку потенциал тока восстановления максимально сдвинут в анодную область и нет наложения линии разряда фона.

4.1 Выбор режима регистрации вольтамперограмм натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата в кислой среде

Величина аналитического сигнала (АС) в режиме КвВ зависит от инструментальных параметров: частоты амплитуды, шага импульса и амплитуды импульса. Зависимость величины тока восстановления соединения **TZV-ОН** от частоты импульса (рисунок 4, а) при амплитуде импульса 0,05 В и шаге импульса 0,01 В линейна в области от 10 до 20 Гц. После увеличения частоты величина тока не возрастает. При сравнении базовых линий остаточного тока при 20 и 50 Гц не наблюдается существенного увеличения тока при 50 Гц. В связи с этим для аналитических целей выбрали частоту 20 Гц [167].

Величина тока восстановления соединения **TZV-ОН** при частоте импульса 20 Гц, шаге развертки 0,01 В и скорости сканирования 0,10 В/с линейно растет при

увеличении амплитуды импульса от 0,02 до 0,05 В (рисунок 4, б). Дальнейшее увеличение амплитуды импульса приводит к уменьшению АС соединения **TZV-OH** [167].

Как видно из рисунка 4.1 (в), величина тока восстановления соединения **TZV - OH** возрастает в интервале скоростей развертки от 0,01 до 0,15 В/с, после чего рост замедляется. Таким образом, для аналитических целей выбрали амплитуду импульса 0,05 В, скорость развертки 0,10 В/с, частоту импульса 20 Гц. При этом форма пиков остается симметричной при скорости сканирования 0,10 В/с [167].

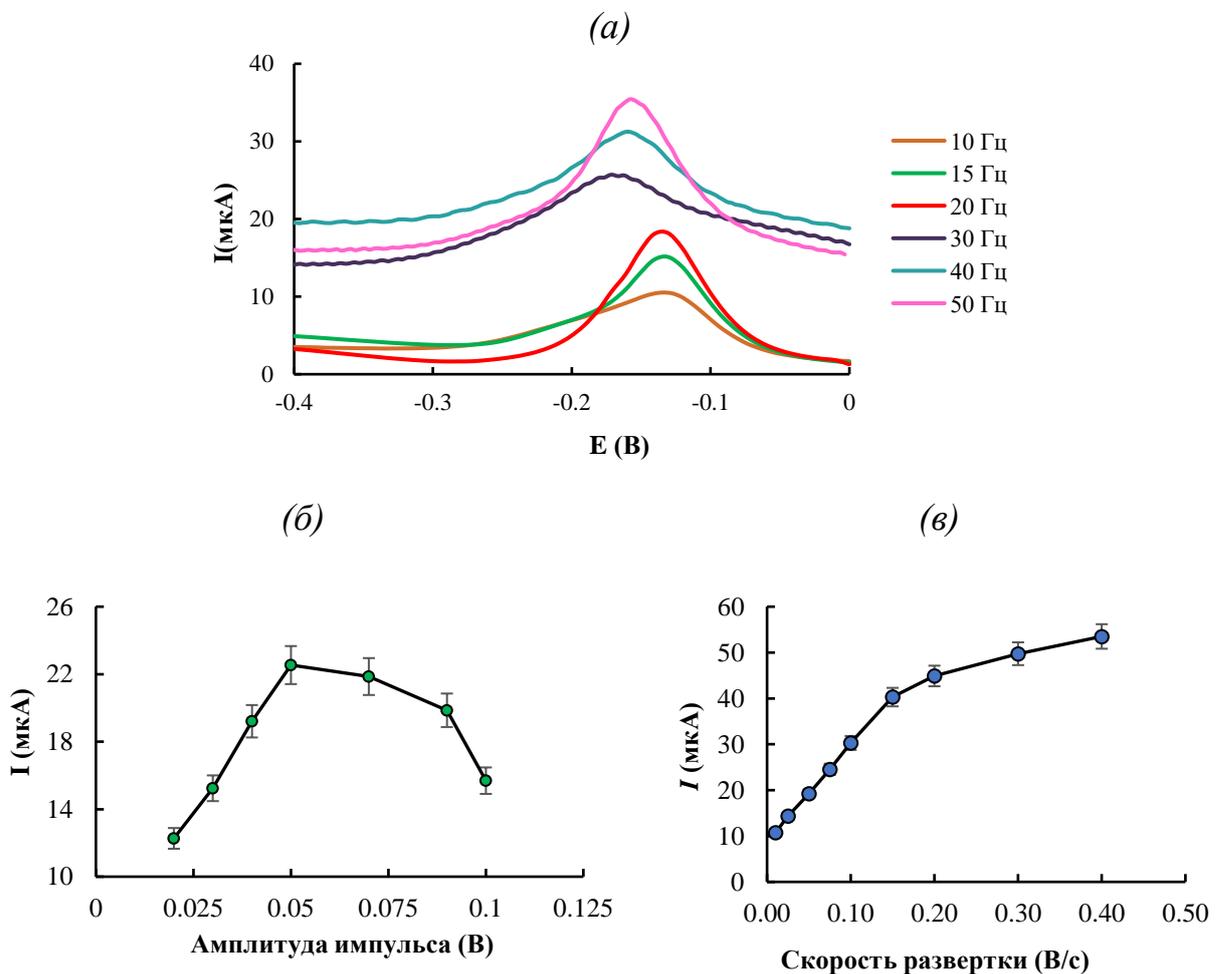


Рисунок 4.1 – Вольтамперограммы, зарегистрированные при разных частотах 50 мг/ дм³ соединения **TZV-OH** (а); зависимости аналитического сигнала для 50 мг/ дм³ соединения **TZV-OH** от амплитуды импульса (б) и скорости сканирования потенциала (в), полученные в растворе ББР с рН 2,0 после физического удаления кислорода. Условия квадратно-волнового режима регистрации ВА: шаг развертки 0,005 В, амплитуда импульса 0,05 В и скорость сканирования 0,10 В/с

Аналогичным образом были подобраны рабочие параметры для регистрации вольтамперограмм для ЛР и ДИП-режимов. Так, при амплитуде модуляции 0,06 В и скорости сканирования 0,01 В/с величина тока соединения **TZV-OH** в ДИП-режиме имеет максимальное значение. Поскольку изменяемым параметром в ЛР является скорость сканирования, то при ее увеличении в диапазоне от 0,05 до 1 В/с ток возрастает линейно ($R^2 = 0,98$). Однако форма пиков остается симметричной в более узком диапазоне (0,05–0,10 В/с), поэтому для аналитических целей была выбрана скорость сканирования 0,1 В/с [167].

На рисунке 4.2 приведены ВА соединения **TZV-OH**, зарегистрированные на СУЭ в ЛР, ДИП и КвВ режимах при выбранных ранее рабочих условиях. Сравнение различных вольтамперометрических режимов при рабочих параметрах позволяет заключить, что КвВ режим является предпочтительным для регистрации токов восстановления соединения **TZV-OH** в ББР при pH $2,0 \pm 0,1$.

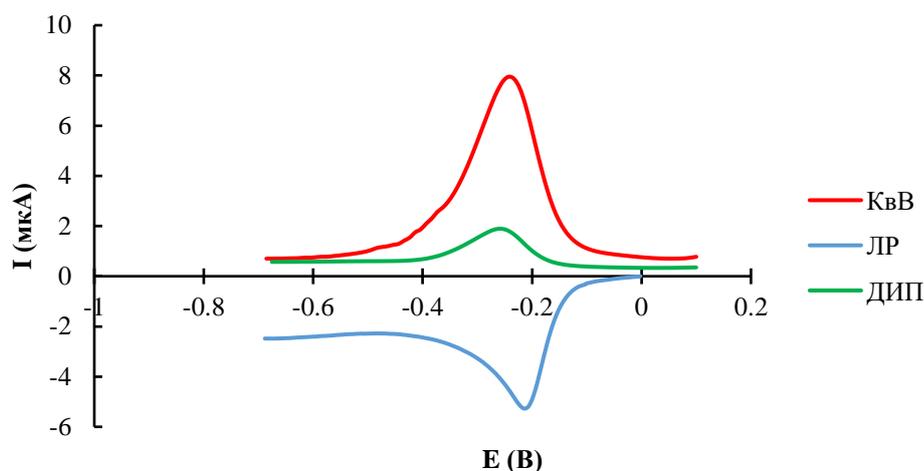


Рисунок 4.2 – Катодные ВА, зарегистрированные на СУЭ в растворе ББР pH $2,0 \pm 0,1$ с добавлением 50 мг/дм^3 соединения **TZV-OH** в различных режимах: ЛР ($v = 0,1 \text{ В/с}$); ДИП ($v = 0,01 \text{ В/с}$ и амплитуде 0,06 В); КвВ ($v = 0,1 \text{ В/с}$, амплитуда импульса 0,07 В, частота 20 Гц)

В случае КвВ пик более симметричный по сравнению с ЛР и может быть измерен с высокой точностью. Величина аналитического сигнала в КвВ-режиме в 4,3 раза выше, чем в ДИП-режиме и в 1,6 раза выше, чем в линейном режиме. Таким образом, дальнейшие исследования проводили в режиме КвВ [167].

4.2 Характеристики градуировочного графика для определения соединения натриевой соли

3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда моногидрата на стеклоуглеродном электроде

При рабочих условиях регистрации АС соединения **TZV-OH** площадь пика восстановления соединения **TZV-OH** линейно увеличивается в интервале концентраций 10–300 мг/дм³ (рисунок 4.3, а), на что указывает коэффициент корреляции ($R^2 = 0,999$). Уравнение регрессии ($n = 5$, $P = 0,95$) S (мкКл) = $(0,021 \pm 0,001) C$ (мг/дм³) + $(0,015 \pm 0,005)$ (мкКл) [167].

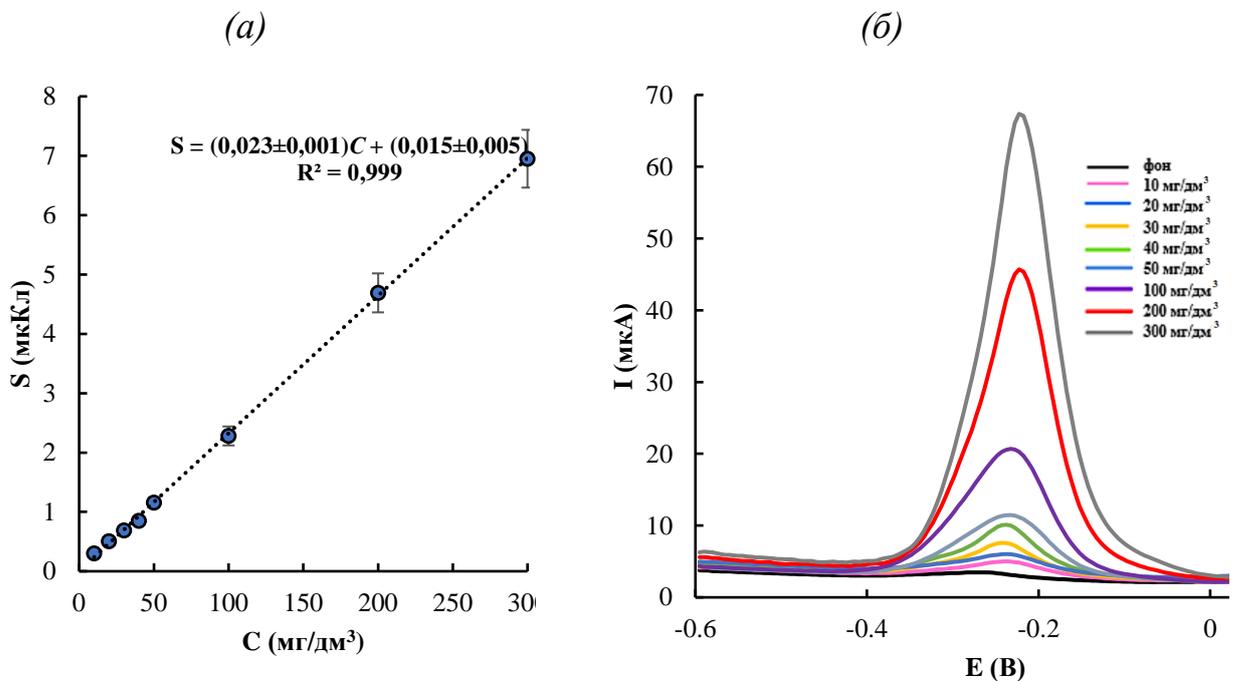


Рисунок 4.3 – Зависимость площади пика восстановления соединения **TZV-OH** от его концентрации в ББР pH 2,0 с физическим удалением кислорода и с добавлением 10–300 мг/дм³ соединения **TZV-OH** (а) и соответствующие квадратно-волновые ВА (б), зарегистрированные на СУЭ со $v = 0,1$ В/с, амплитудой импульса 50 мВ и частотой 20 Гц. ($n = 5$, $P = 0,95$)

Предел обнаружения и предел количественного определения были рассчитаны из уравнения градуировочной зависимости в диапазонах концентрации от 10 до 50 мг/дм³ соединения **TZV-OH** S (мкКл) = $(0,021 \pm 0,003) C$ (мг/дм³) + $(0,11 \pm 0,01)$ (мкКл). Полученные данные представлены в таблице 4.1 [167].

Таблица 4.1 – Расчет ПО для **TZV-ОН** в ББР рН 2,0 на СУЭ с физическим удалением кислорода

Характеристика	Значение
Диапазон концентрации	10–50 мг/дм ³
Уравнение прямой	S (мкКл) = $(0,021 \pm 0,003) C$ (мг/дм ³) + $(0,11 \pm 0,01)$ (мкКл)
Коэффициент корреляции	0,99
ПО, мг/дм ³	1,3
ПКО, мг/дм ³	4,1

Показатель правильности рассчитывали для уровней концентраций 50, 100, 200 мг/дм³ по методу «введено – найдено». Каждое определение повторяли три раза (таблица 4.2). Показатель правильности (R , %) для различных уровней концентраций близок к 100 % со средним значением $100,8 \pm 2,9$ %. Доверительный интервал среднего для R включает значение 100 %. Значение стандартного отклонения (СО) составило 3,9, а относительного стандартного отклонения (RSD, %) – 4,8 % [167].

Таблица 4.2 – Оценка правильности методики по методу «введено – найдено» для 50,0, 100,0, 200,0 мг/дм³ **TZV-ОН** в ББР рН 2,0 ($n = 9$, $P = 0,95$)

Параметры	$C_{\text{TZV-ОН}}$, мг/дм ³			$R_{\text{cp}} \pm \Delta R$, %	СО	RSD, %
	50,0	100,0	200,0			
R , %	104,7	103,1	103,6	$100,8 \pm 2,9$	3,9	4,8
	96,3	101,7	102,7			
	92,5	101,2	101,8			

Ранее в главе 3 в п. 3.1 было выдвинуто предположение, что механизм электропревращения **TZV-ОН**, вероятнее всего, подобен во всем исследуемом диапазоне рН. Благодаря этому с целью экономии времени при выполнении

количественного контроля потенциального лекарственного препарата была предложена процедура удаления кислорода посредством добавления раствора сульфита натрия при рН 7,0. Данный способ был использован авторами [140, 168] при количественном определении соединения из ряда нитроазолоазинов – аргининиевой солью 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидин-7-она моногидрата, являющимся потенциальным противовирусным препаратом и структурным аналогом Триазавирин®. Поэтому далее в качестве рабочих условия была выбрана среда ББР с нейтральным значением рН и с химическим удалением кислорода.

4.3 Вольтамперометрическое определение натриевой соли

3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда моногидрата в нейтральной среде

На основе материала, представленного в п. 4.1–4.3, был осуществлен подбор условия для разработки методики вольтамперометрического определения **TZV-ОН** в ББР при рН $7,0 \pm 0,1$ с химическим удалением кислорода. Установлено, что квадратно-волновой режим с параметрами: амплитуда 50 мВ, частота 20 Гц, скорость 0,15 В/с является приемлемым для вольтамперометрического определения **TZV-ОН**.

При рабочих условиях регистрации АС соединения **TZV-ОН**, значения величины тока восстановления и площади пика линейно растут в интервале 10– 300 мг/дм³, на что указывает коэффициент корреляции (рисунок 4.4, *а* и *б*).

В качестве АС использовали величину площади под пиком восстановления, поскольку форма кривых вольтамперограмм, представленных на рисунке 4.4, *в*, имеет несимметричную форму, вследствие чего измерение высоты пика является некорректным. При этом из представленных ВА видно, что пики растут симметрично, значение полуширины пика остается постоянным. Все это указывает на правильность выбора параметров для регистрации **TZV-ОН**.

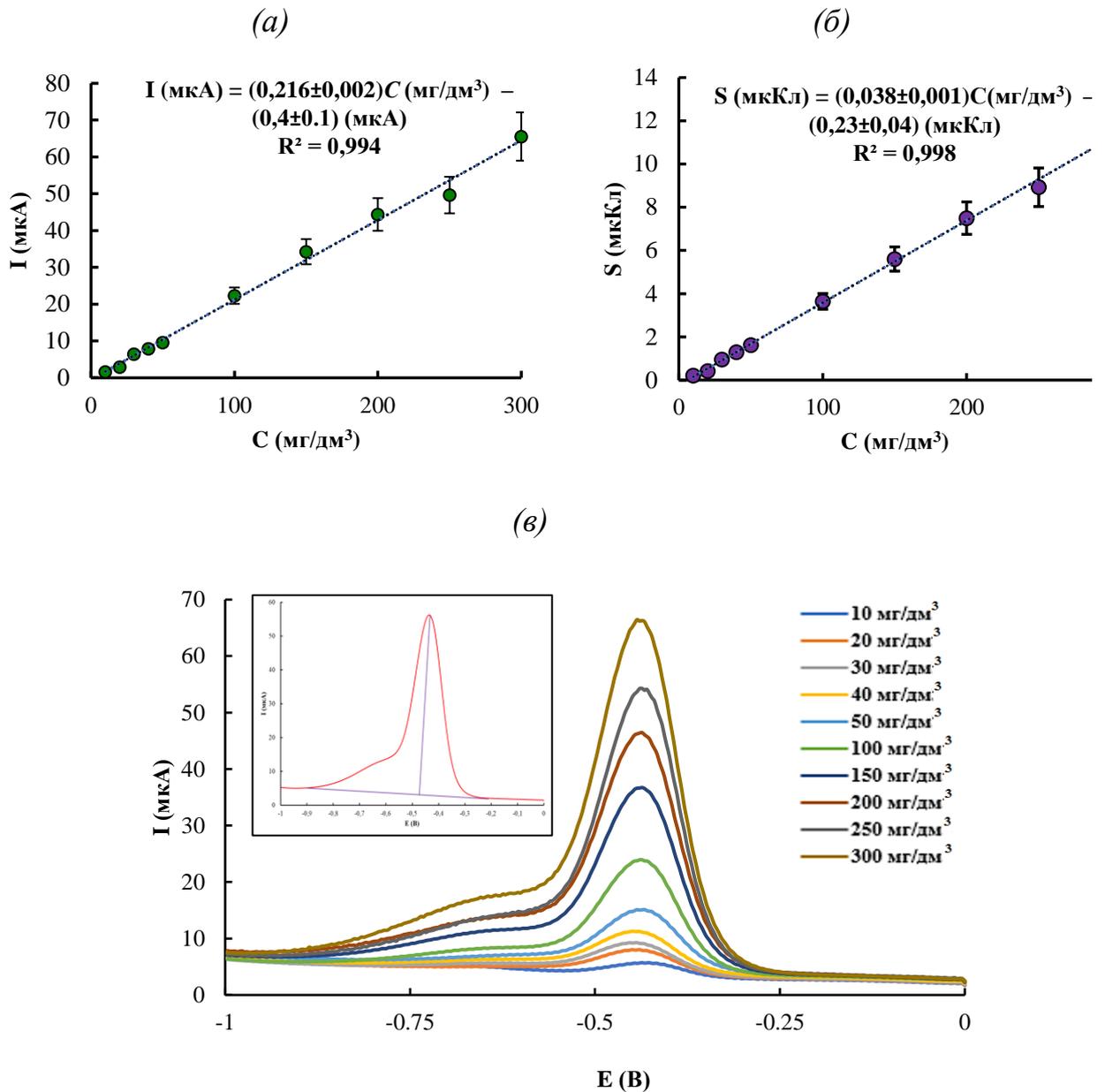


Рисунок 4.4 – Зависимость тока (а) и площади пика восстановления (б) соединения **TZV-OH** от его концентрации в ББР pH $7,0 \pm 0,1$ ($10\text{--}300 \text{ мг/дм}^3$) + $0,04 \text{ M Na}_2\text{SO}_3$ и соответствующие квадратно-волновые вольтамперограммы (в), зарегистрированные на СУЭ со скоростью развертки потенциала $0,15 \text{ В/с}$, амплитудой импульса 50 мВ и частотой 20 Гц ($n = 3, p = 0,95$). Вставка – измерение АС **TZV-OH**.

Рассчитаны предел обнаружения и предел количественного определения из градуировочной зависимости в диапазонах концентрации от 10 до 50 мг/дм^3 соединения **TZV-OH** в ББР при pH $7,0$ $S \text{ (мкКл)} = (0,037 \pm 0,006) c \text{ (мг/дм}^3) - (0,21 \pm 0,02) \text{ (мкКл)}$. Полученные данные представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Расчет ПО для **TZV-ОН** в ББР рН 7,0 на СУЭ с химическим удалением кислорода

Характеристика	Значение
Диапазон концентрации	10–50 мг/дм ³
Уравнение прямой	S (мкКл) = $(0,037 \pm 0,006) c$ (мг/дм ³) – $(0,21 \pm 0,02)$ (мкКл)
Коэффициент корреляции	0,99
ПО, мг/дм ³	1,7
ПКО, мг/дм ³	5,2

Показатель правильности рассчитывали для уровней концентраций 50, 100, 200 мг/дм³ по методу «введено – найдено». Каждое определение повторяли три раза. Показатель правильности (R , %) для различных уровней концентраций близок к 100% со средним значением $98,3 \pm 1,3$ % (таблица 4.4). Доверительный интервал среднего для R включает значение 100 %. Значение стандартного отклонения составило 1,6, а относительного стандартного отклонения – 1,8 %.

Таблица 4.4 – Оценка правильности методики по методу «введено – найдено» для 50,0, 100,0, 200,0 мг/дм³ **TZV-ОН** в ББР рН 7,0 ($n = 9$, $P = 0,95$)

Параметры	$C_{\text{TZV-ОН}}$, мг/дм ³			$R_{\text{cp}} \pm \Delta R$, %	СО	RSD, %
	50,0	100,0	200,0			
R , %	99,7	98,6	98,6	$98,3 \pm 1,3$	1,6	1,8
	98,3	97,9	98,3			
	98,3	97,3	98,3			

Выводы к главе 4

1. Разработан способ вольтамперометрического определения натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины моногидрата на стеклоуглеродном электроде как с физическим удалением кислорода при рН 2,0, так и с химическим удалением кислорода посредством добавления сульфита натрия в раствор с нейтральным значением рН.

2. Продемонстрировано, что квадратно-волновой режим с подобранными рабочими параметрами (скорость развертки потенциала 0,15 В/с, амплитудой импульса 50 мВ и частотой 20 Гц) является предпочтительным для регистрации вольтамперограмм натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины моногидрата на стеклоуглеродном электроде в обеих средах.

3. Аналитические характеристики разработанного способа на стеклоуглеродном электроде с **физическим удалением кислорода в кислых значениях рН** составляют: диапазон концентрации от 10 до 300 мг/дм³, предел обнаружения – 1,3 мг/дм³, предел количественного определения обнаружения – 4,1 мг/дм³. Показатель правильности, рассчитанный по методу «введено – найдено» для различных уровней концентраций, близок к 100 %. Значение стандартного отклонения – 3,9, а относительного стандартного отклонения – 4,8 %.

4. Аналитические характеристики разработанного способа на стеклоуглеродном электроде с **химическим удалением кислорода в нейтральном значении рН** составляют: диапазон концентрации от 10 до 300 мг/дм³, предел обнаружения – 1,7 мг/дм³, предел количественного определения обнаружения – 5,2 мг/дм³. Показатель правильности, рассчитанный по методу «введено – найдено» для различных уровней концентраций, близок к 100 %. Значение стандартного отклонения – 1,6, а относительного стандартного отклонения – 1,8 %.

ГЛАВА 5 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ

3-НИТРО-4-ОКСО-7-ЭТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]

ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА, НАТРИЕВОЙ СОЛИ

3-НИТРО-4-ОКСО-7-ПРОПИЛЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]

ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА, НАТРИЕВОЙ СОЛИ

3-НИТРО-4-ОКСО-7-БУТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4]

ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА

5.1. Электрохимическое поведение натриевой соли

**3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида
дигидрата, натриевой соли**

**3-нитро-4-оксо-7-пропиллтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида
дигидрата, натриевой соли**

**3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида
дигидрата и сравнение его с натриевой соли**

**3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида
дигидрата**

Методом циклической вольтамперометрии в ББР при рН $2,0 \pm 0,1$ на СУЭ было исследовано электрохимическое поведение соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** и **Br** (рисунок 5.1). Как видно, соединения **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu**, содержащие в своей структуре нитрогруппы, дают два последовательных необратимых пика восстановления. Первый пик находится в диапазоне потенциалов от $-0,27$ до $-0,3$ В, второй – от $-1,05$ до $-1,13$ В, которые сопоставимы с потенциалами гетероциклических нитросоединений [5, 6, 8, 18, 22, 23]. При этом соединение **Br**, содержащее в своей структуре атом брома вместо нитрогруппы, дает один пик восстановления при потенциале $-0,9$ В.

На анодной части вольтамперограмм после изменения направления развертки потенциала наблюдаются необратимые пики продуктов электровосстановления соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** при близких потенциалах в диапазонах +0,4 до +0,5 В. Близость значений потенциалов окисления указывает на образование близких по структуре продуктов электровосстановлений соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** [5]. Вероятно, при данных потенциалах окисляется анион соответствующего гидросиламинного производного, что согласуется с литературными данными [20, 22, 67].

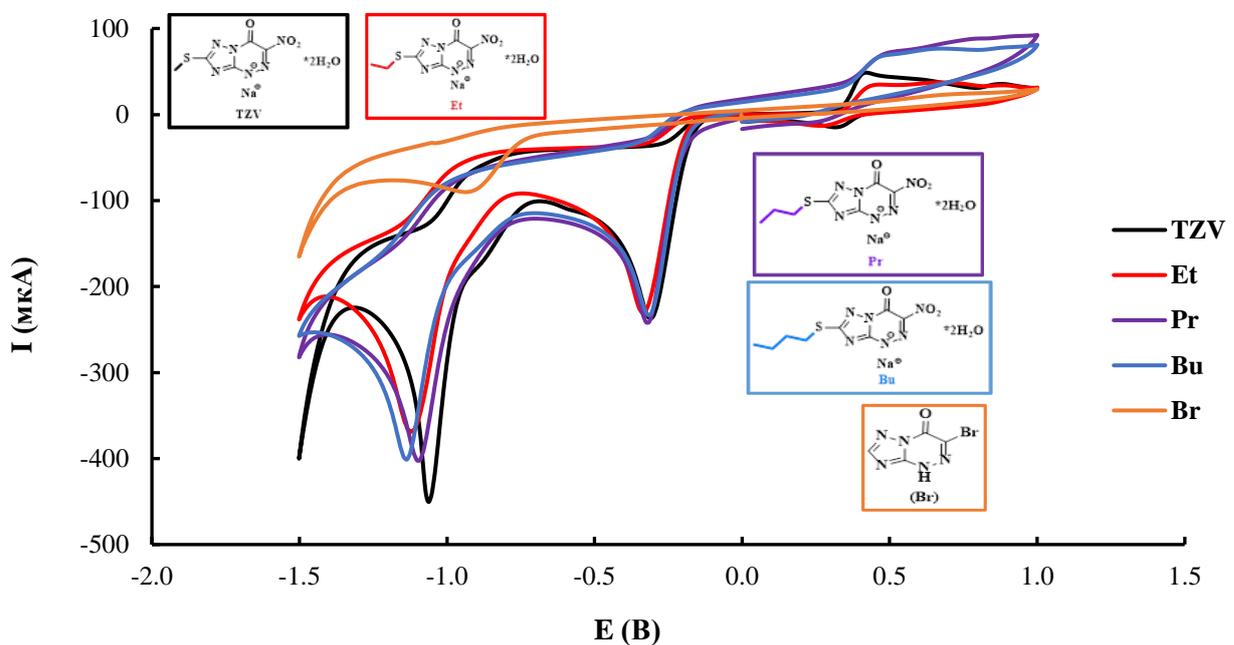


Рисунок 5.1 – Циклические вольтамперограммы 5 ммоль/дм³ соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu**, **Br**, зарегистрированные на СУЭ ($S = 7,065 \text{ мм}^2$) в растворе ББР при pH $2,0 \pm 0,1$ при скорости сканирования 0,1 В/с

Ранее было проведено исследование электрохимического поведения соединения **TZV** в ББР pH 2,0 и доказано, что восстановление происходит именно за счет нитрогруппы, сопряженной с гетероциклической системой [5]. Таким образом, можно предположить, что катодные пики восстановления исследуемых соединений **Et**, **Pr**, **Bu** обусловлены электровосстановлением нитрогруппы.

Удлинение тиольного хвоста в 7 положении триазинового цикла существенно не влияет на потенциал и величину токов электровосстановления соединения **Et**,

Pr, **Bu** на первой стадии, что было также показано в работе [169]. Более того, значения величин токов первой стадий у **всех соединений** практически равное.

Известно, что на электровосстановление нитрогруппы значительное влияние оказывает рН среды [18, 20, 29, 30]. Из рисунка 5.2 можно заметить, что рН влияет как на величину тока, так и на потенциал восстановления **всех соединений**.

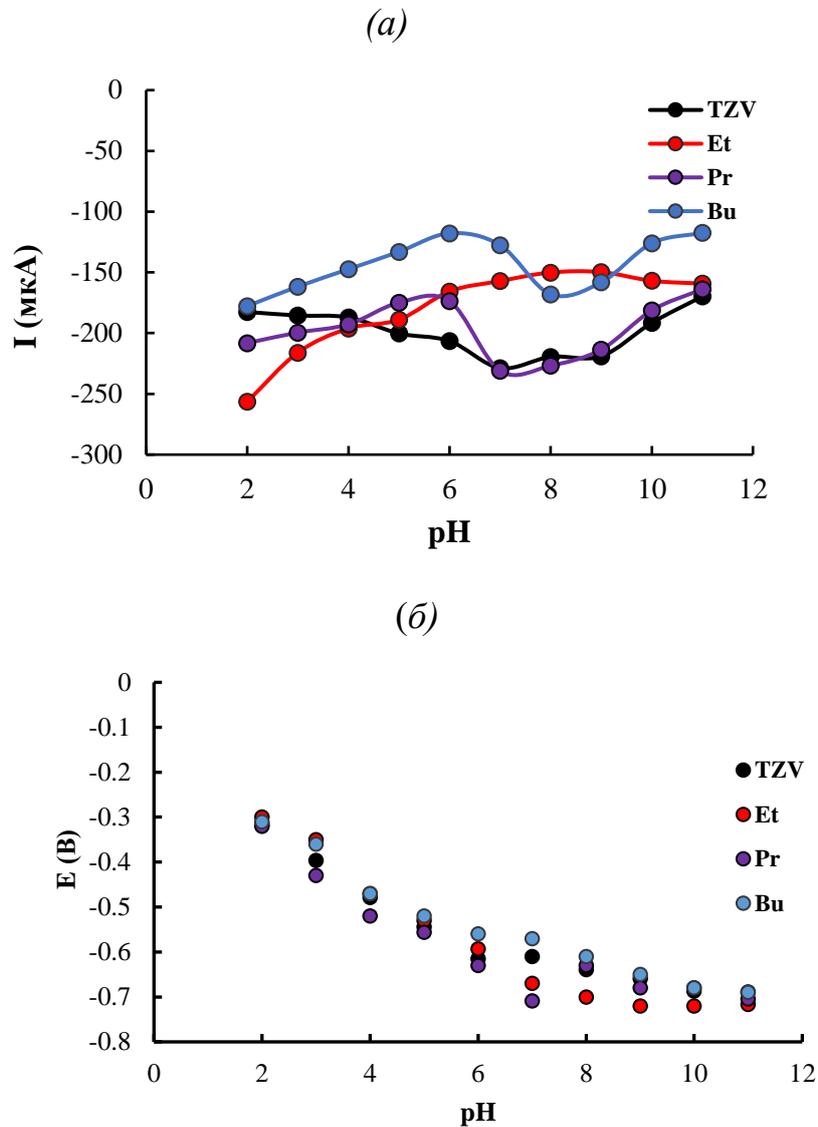


Рисунок 5.2 – Зависимость величины тока первого пика восстановления (а) для 5 ммоль/дм³ **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** ($S = 3,14 \text{ мм}^2$) и (б) значений его потенциала от рН среды

Из рисунка 5.2 (а) видно, что характер зависимости величины тока от рН среды для соединений **Pr**, **Bu** аналогичен с **TZV** [5]: в диапазоне рН фонового электролита от 2,0 до 5,0 наблюдается плавное уменьшение абсолютной величины тока, в нейтральной среде прослеживается их максимум, при дальнейшем увеличении рН

зависимость тока от рН становится пологой достигает своего минимума. В случае соединения **Et** характерно постепенное уменьшение величины тока с увеличением рН раствора. Для **всех соединений** наблюдается максимум величины тока при рН $2,0 \pm 0,1$ и $7,0 \pm 0,1$.

Зависимости потенциалов электровосстановления соединений **Et**, **Pr**, **Bu** от рН (рисунок 5.2, б) могут свидетельствовать об участии протонов в электрохимическом процессе. В диапазоне рН от $2,0 \pm 0,1$ до $7,0 \pm 0,1$ наблюдается линейный сдвиг величины потенциала в катодную область, что может говорить о затруднении процессов электровосстановлений **Et**, **Pr**, **Bu** вследствие недостатка протонов. В щелочной области рН значения катодных потенциалов **Et**, **Pr**, **Bu** стабилизируются. Это также может косвенно указывать на присутствие реакции образования оксимов в кислой и нейтральной рН подобно процессам, описанным для **TZV** [5].

Кроме того, не исключено, что кислотно-основное равновесие соединений, которое характерно для данного класса веществ, влияет на путь электропревращения. Для них типично нахождение как в ионной, так и в протонированной форме в зависимости от рН среды. Об этом также свидетельствуют значения pK_a , полученные потенциометрическим и оптическими методами: для **Et** – 2,47, **Pr** – 2,52, **Bu** – 2,67. Все значения pK_a близки к найденным ранее для структурных аналогов исследуемых соединений [170].

Учитывая структурное сходство исследуемых соединений с **TZV**, можно предположить, что электропревращения **Et**, **Pr**, **Bu** в водных средах также протекает через образование протонированной формы молекул. Исследования влияния доноров протонов на электровосстановление соединений в апротонной среде путем добавления уксусной кислоты (НАс) были проведены для подтверждения данного предположения. Из рисунка 5.3 видно, что добавление уксусной кислоты приводит к увеличению величины тока восстановления и смещению значения потенциала в более анодную область. Вероятно, сдвиг первой предволны при потенциалах $-0,85$ В, $-0,77$ В, $-0,78$ В для **Et**, **Pr**, **Bu**, соответственно, связаны, со стабилизацией молекулы в виде гетероциклического

иона ввиду реакции самопротонирования из-за нехватки доноров протонов. Подобный характер электровосстановления был изучен в работе [6] для структурного аналога данных веществ – аргининиевой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидин-7-она моногидрата. Таким образом, можно предположить, что в протонированных средах соединения **Et**, **Pr**, **Bu** восстанавливаются как протонированная частица, а в апротонных как гетероциклический ион.

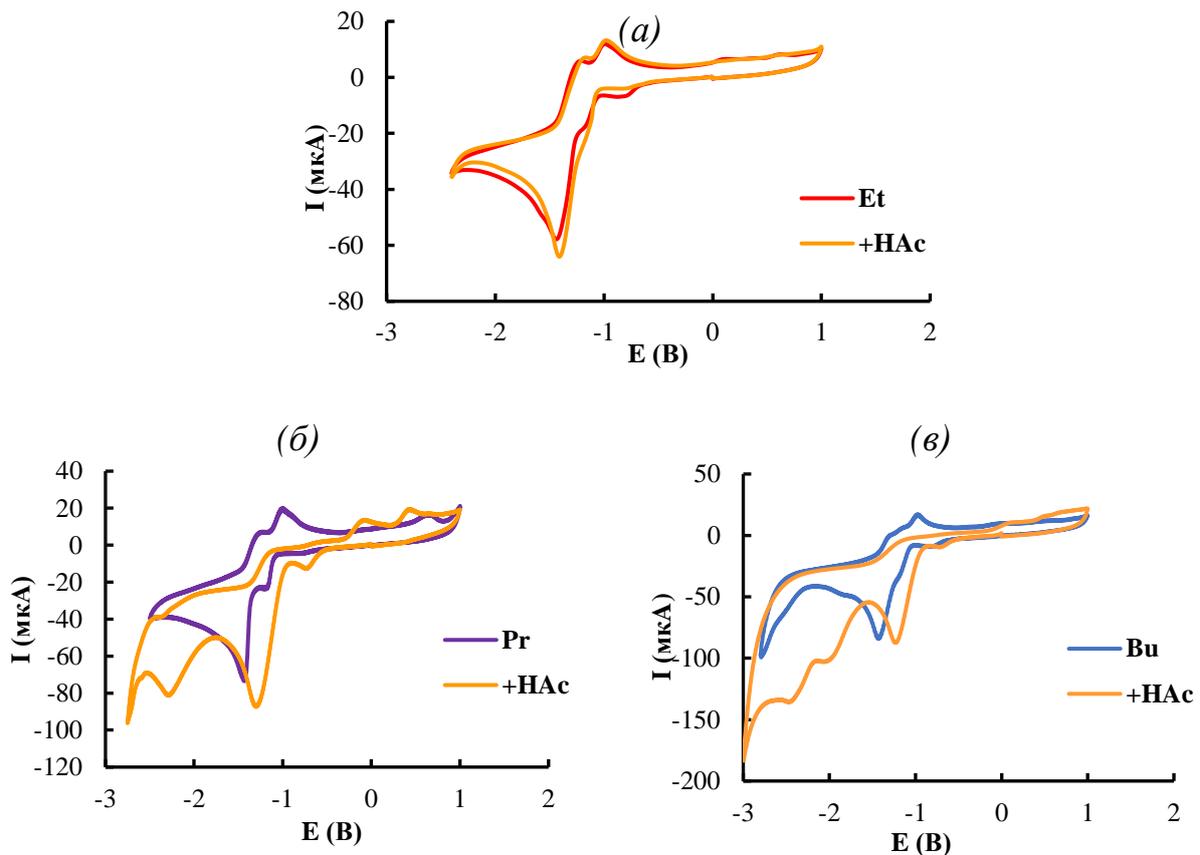


Рисунок 5.3 – Циклические вольтамперограммы **Et**, **Pr**, **Bu** ($C = 5$ ммоль/дм³), зарегистрированные на СУЭ ($S = 3,14$ мм²) при скорости сканирования 0,1 В/с в растворе 0,05 моль/дм³ Bu₄NBF₄ в ДМФА с физическим способом удаления кислорода с добавлением HAc

Важной частью изучения механизма является установление кинетики электрохимической реакции. Для установления лимитирующей стадии процесса были зарегистрированы ЦВА **Et**, **Pr**, **Bu** в растворе ББР при pH 2,0±0,1 в диапазоне скоростей 0,01–15,00 В/с. Из зависимостей величины тока **Et**, **Pr**, **Bu** от квадратного

корня скорости развертки, представленных на рисунке 5.4, можно предположить, что электровосстановление соединения **Et** лимитируется диффузией, поскольку зависимость $I=f(v^{0.5})$ линейна на всем диапазоне скоростей. Для соединений **Pr** и **Bu** кинетика электрохимической реакции – диффузия, осложненная предшествующей химической реакцией, поскольку наблюдается отклонение графика от линейности $I=f(v^{0.5})$ [5].

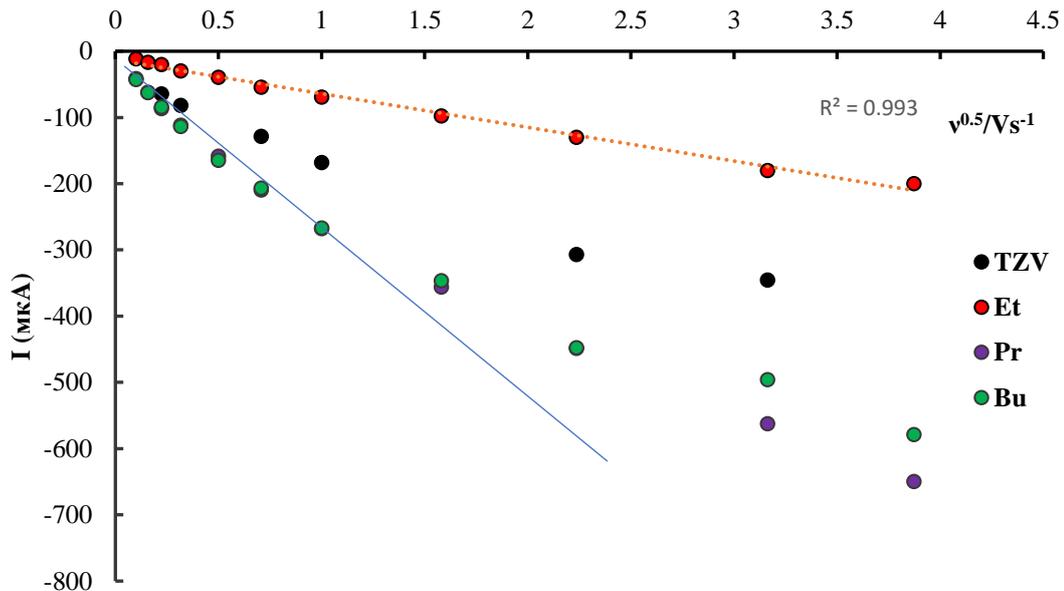


Рисунок 5.4 – Зависимость величины тока первого пика электровосстановления соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** ($C = 5$ ммоль/дм³) от квадратного корня скорости сканирования в растворе ББР при pH 2,0

Подтверждением вышесказанного предположения является рассчитанный критерий Семерано [161], представленный в таблице 5.1. Для соединения **Et** это значение близко к 0,5, что также свидетельствует о диффузионном контроле электрохимического восстановления. Для соединений **Pr**, **Bu** критерий существенно меньше 0,5, это может указывать на осложнение диффузионного процесса предшествующей химической реакцией [5].

Использование температурно-кинетического метода позволило [169, 170] рассчитать эффективную энергию активации и коэффициент переноса электрона (α), данные по которым представлены в таблицах 5.2 и 5.3. Для соединения **Et**

значение эффективной энергии активации близко к 3 ккал/моль, что подтверждает тот факт, что лимитирующей стадией является чистая диффузия. Для соединений **Pr** и **Bu** значение энергии активации несколько превышает значения 5 ккал/моль, что дополнительно может свидетельствовать об осложнении диффузии предшествующей химической реакцией.

Таблица 5.1 – Рассчитанные критерий Семерано, эффективные энергии активации для соединений **Et**, **Pr**, **Bu**

Соединение	Критерий Семерано	$W_{\text{эфф. акт}}$, ккал/моль
Et	$\lg I = -(0,49 \pm 0,01) \lg v - (4,03 \pm 0,08) R^2 = 1,0$	3,85
Pr	$\lg I = -(0,36 \pm 0,02) \lg v - (4,20 \pm 0,05) R^2 = 0,998$	5,80
Bu	$\lg I = -(0,41 \pm 0,02) \lg v - (4,00 \pm 0,05) R^2 = 0,998$	6,96

Расчет эффективного числа электронов n_e , участвующих в электрохимической реакции электровосстановления **Et**, **Pr**, **Bu**, был произведен четырьмя параллельными способами (таблица 5.2). Среднее количество электронов, принимающих участие на 1 стадии электровосстановления, составило 4 для соединения **Et**, а для **Pr**, **Bu** – 3. Для соединений **Pr** и **Bu** n_e , полученное по уравнению Рендлса – Шевчика, приближается к значению 4, что согласуется с классической схемой электровосстановления нитросоединений и тем самым может являться приближенным к истинному.

Стоит отметить, что занижение результатов **Pr** и **Bu**, полученных по ХА, вероятно, связано, как в случае и с **TZV**, с предшествующей стадией образования оксимов [5]. Таким образом, количество электронов, участвующих в электровосстановлении соединений **Et**, **Pr**, **Bu** на первой стадии в водной среде, близко к 4. Учитывая, что электровосстановление **всех соединений** на первой стадии происходит с присоединением 4-х электронов, то по уравнению Коттрела были рассчитаны коэффициенты диффузии ионов соединений **Et**, **Pr**, **Bu**, значения которых согласуются с литературными данными [164].

Таблица 5.2 – Средние значения рассчитанного числа электронов, участвующих в первой стадии электровосстановления соединений **Et**, **Pr**, **Bu** в растворе ББР pH = 2,0

Соединение	По хроноамперограмме			По ЦВА	α	D , см ² /с
	n_1	n_2	n_3	n_4		
Et	4,01	3,67	3,94	3,97	0,48	$1,02 \times 10^{-6}$
Pr	2,68	2,49	3,7	2,72	0,24	$0,4 \times 10^{-5}$
Bu	2,96	2,48	3,93	3,10	0,32	$0,6 \times 10^{-5}$

Примечание: n^1_e – количество электронов, полученное отношением количества электричества вещества с количеством электричества модельной редокс-пары $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ в тех же самых условиях; n^2_e – количество электронов, полученное отношением величины тока вещества с током модельной редокс-пары $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ в тех же самых условиях; n^3_e – количество электронов, полученное по уравнению Рендлса – Шевчика для необратимых систем, учитывая что $\alpha = 0,37$ [157]; n^4_e – по уравнению Коттрелла, принимая во внимание, что значение коэффициента диффузии для нитроароматических соединений в водных средах близко к 10^{-5} см²/с [164]

Таким образом, электровосстановление **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** протекает необратимо в две ступени за счет восстановления нитрогруппы с участием 4-х электронов на первой стадии. Электропревращения всех соединений в водной среде протекает в виде протонированных частиц, в апротонной среде – в виде ионных пар с катионами натрия. Показано, что для всех соединений характерно затруднение процесса восстановления среды вследствие нехватки доноров протонов.

Несмотря на структурную схожесть соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu**, наблюдаются различия в их электропревращениях. Электровосстановление нитрогруппы соединения **Et** лимитируется только диффузией в отличие от оставшихся соединений, в которых процесс лимитируется диффузией, осложненной предшествующей химической реакцией. Электропревращения нитрогруппы соединения **Et** отличаются по изменению величины тока в диапазоне pH от 2,0 до 11,0 от соединений **TZV**, **Pr**, **Bu**, у которых наблюдается различие в кинетике электродных реакции в кислой, нейтральной и щелочной средах.

Поскольку первая стадия у соединений **Et**, **Pr**, **Bu** и **TZV** протекает при близких электродных потенциалах в водных средах и с участием 4-х электронов, а также электровосстановление соединений происходит в виде протонированных частиц, то можно предположить, что, как и в случае **TZV**, электропревращения **Et**, **Pr**, **Bu** могут протекать через образования интермедиатов радикальной природы, а именно анион-радикала. Поэтому дальнейшим этапом являлось установление наличия радикальных частиц комбинированным методом ЭПР-спектроскопии и электрохимии и квантово-химическими расчетами.

5.2 Изучение продуктов электровосстановления соединений натриевой соли

3-нитро-4-оксо-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата, натриевой соли

3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата, натриевой соли

3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата, натриевой соли

3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата методом ЭПР-спектроскопии и квантово-химическими расчетами

На первом этапе были проведены ЭПР-исследования в апротонной среде (ДМФА) с целью стабилизации анион-радикала. Прямым способом зафиксировать увеличение парамагнитной активности радикальных частиц в процессе электрогенерирования при потенциале после первого пика восстановления соединения **Et**, **Pr**, **Bu**, как и в случае соединения **TZV**, не удалось. По-видимому, это также связано с неустойчивостью промежуточного продукта радикальной природы. Поэтому, предполагая наличие короткоживущих радикалов, как и в случае с **TZV**, проведена регистрация ЭПР-спектров взаимодействия продуктов электровосстановления соединений **Et**, **Pr**, **Bu** с добавлением в раствор спинового зонда ТМТН, которые являются стабильными в течение десятков минут, что позволяет построить зависимость количества образующихся парамагнитных

частиц от времени. Зависимости количества парамагнитных центров каждого соединения с добавлением спинового зонда от времени электрогенерирования в водной среде (ББР рН 7,0) и апротонной среде (ДМФА) представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Зависимости количества парамагнитных центров (N) от времени (τ) электрохимического синтеза соединения **Et**, **Pr**, **Bu** ($C = 2$ ммоль/дм³) в водной (ББР (рН 7,0)) и апротонной средах (ДМФА) с добавлением спинового зонда ТМТН ($C = 2$ ммоль/дм³)

Соединение	Уравнения регрессии	
	водная	апротонная
TZV	$N = 0,29\tau + 0,99$	$N = 0,12\tau + 1,32$
Et	$N = 0,60\tau + 1,56$	$N = 0,19\tau + 0,54$
Pr	$N = 0,39\tau + 1,00$	$N = 0,135\tau + 1,48$
Bu	$N = 0,41\tau + 1,24$	$N = 0,138\tau + 0,13$
фон	$N = 0,005\tau + 0,04$	$N = 0,006\tau + 0,04$

Отсутствие роста количества парамагнитных частиц в холостом опыте и значительный их рост в присутствии ТМТН во времени электрогенерирования может косвенно указывать на радикальный характер промежуточных продуктов электропревращения соединения **Et**, **Pr**, **Bu**. Сравнение уравнений зависимостей количества парамагнитных центров для всех соединений от времени электрогенерирования в апротонной и водной средах показало, что тангенс угла наклона прямой в водной среде больше, чем в апротонной. Это может дополнительно указывать на непосредственное участие протонов в процессе образования продуктов радикальной природы соединения **Et**, **Pr**, **Bu**. Сравнение данных зависимостей у **всех соединений** дает основания полагать, что у соединения **Et** по сравнению с оставшимися соединениями образуется больше интермедиатов радикальной природы как в водных средах, так и в апротонных растворителях.

ЭПР-спектры продуктов взаимодействия спинового зонда ТМТН с электрогенерированными анион-радикалами **Et**, **Pr**, **Bu** лишь косвенно указывают их наличие. Поэтому для подтверждения наличия промежуточных

частиц был получен ЭПР-спектр взаимодействия спиновой ловушки DMPO с продуктом электрохимического восстановления соединения **Et**, **Pr**, **Bu** в ДМФА (рисунок 5, вставка). Линейная зависимость концентрации спиновых аддуктов взаимодействия DMPO с продуктами электровосстановления соединений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** от времени также указывает на рост парамагнитных частиц во времени, что может свидетельствовать о радикальном механизме реакции электровосстановления соединения **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** (рисунок 5.5).

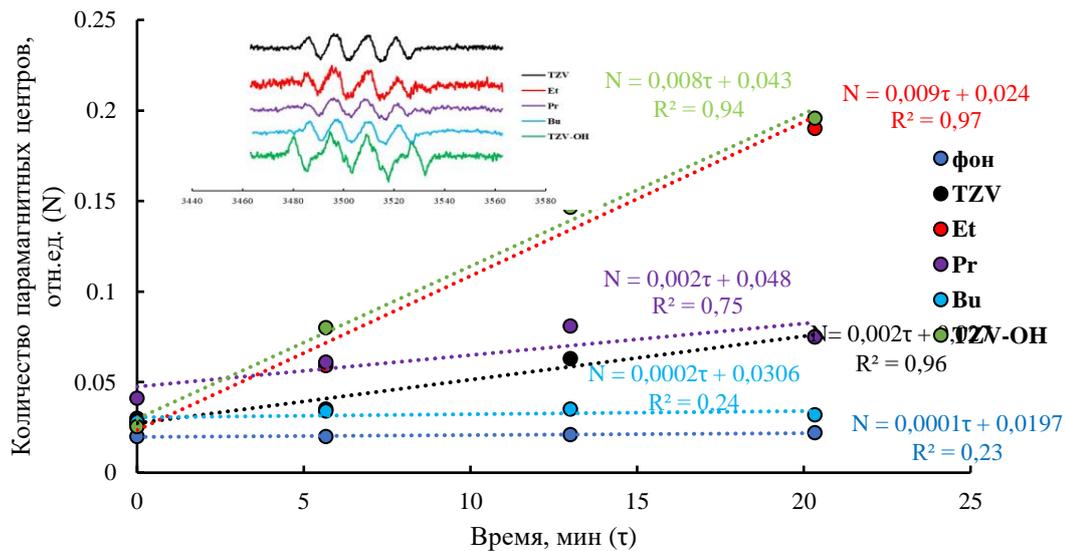


Рисунок 5.5 – Зарегистрированные ЭПР-спектры (вставка) аддуктов спиновой ловушки DMPO ($C = 20$ ммоль/дм³) с продуктом электровосстановления соединения **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** ($C = 200$ ммоль/дм³) в ДМФА и соответствующие зависимости концентрации аддуктов спиновой ловушки от времени

При сравнении тангенсов угла наклона зависимостей концентрации спиновых аддуктов от времени для **всех соединений** можно предположить, что при электровосстановлении **Et** образуется больше интермедиатов радикальной природы, чем у **оставшихся веществ**, что согласуется с вышесказанным предположением.

Для установления вероятного строения промежуточных парамагнитных частиц было проведено моделирование путей электрохимических превращений с помощью квантово-химических расчетов с использованием термодинамических параметров. При моделировании предварительно рассмотрены различные варианты процессов восстановления и протонирования на основе схемы

восстановления нитросоединений [156, 160]. Были предложены возможные пути превращения исследуемых молекул (рисунки 5.6–5.8 (а)). Для **всех соединений** наиболее выгодным является последующий перенос электрона и стадия протонирования дианион-радикала. Карта распределения электростатического потенциала была построена для определения наиболее возможных центров протонирования дианион-радикала. По данным из карты распределения электростатического потенциала наиболее вероятными точками протонирования для **всех соединений**, включая **TZV** (см. главу 3) является нитрогруппа, что согласуется с проведенными квантово-химическими расчетами ($\Delta G = -12,46$ эВ и $\Delta G = -12,39$ эВ) и атом азота в I положении шестичленного кольца гетероцикла ($\Delta G = -12,40$ эВ). Также для **всех соединений** следующей возможной стадией является взаимодействие с ДМРО с образованием **Et(2)**, **Pr(2)**, **Bu(2)** интермедиата. Вероятен процесс дополнительного протонирования и взаимодействия между спиновой ловушкой ДМРО с продуктом электровосстановления соединений и образованием аддуктов под номерами **(3)** и **(4)**. Экспериментально полученные и смоделированные ЭПР-спектры для всех соединений, приведенные для соотношения аддуктов **(2):(3):(4)** как 3:1:0.33, настолько близки, что свидетельствуют о возможности образования данных аддуктов в смеси (рисунки 5.6–5.8, б).

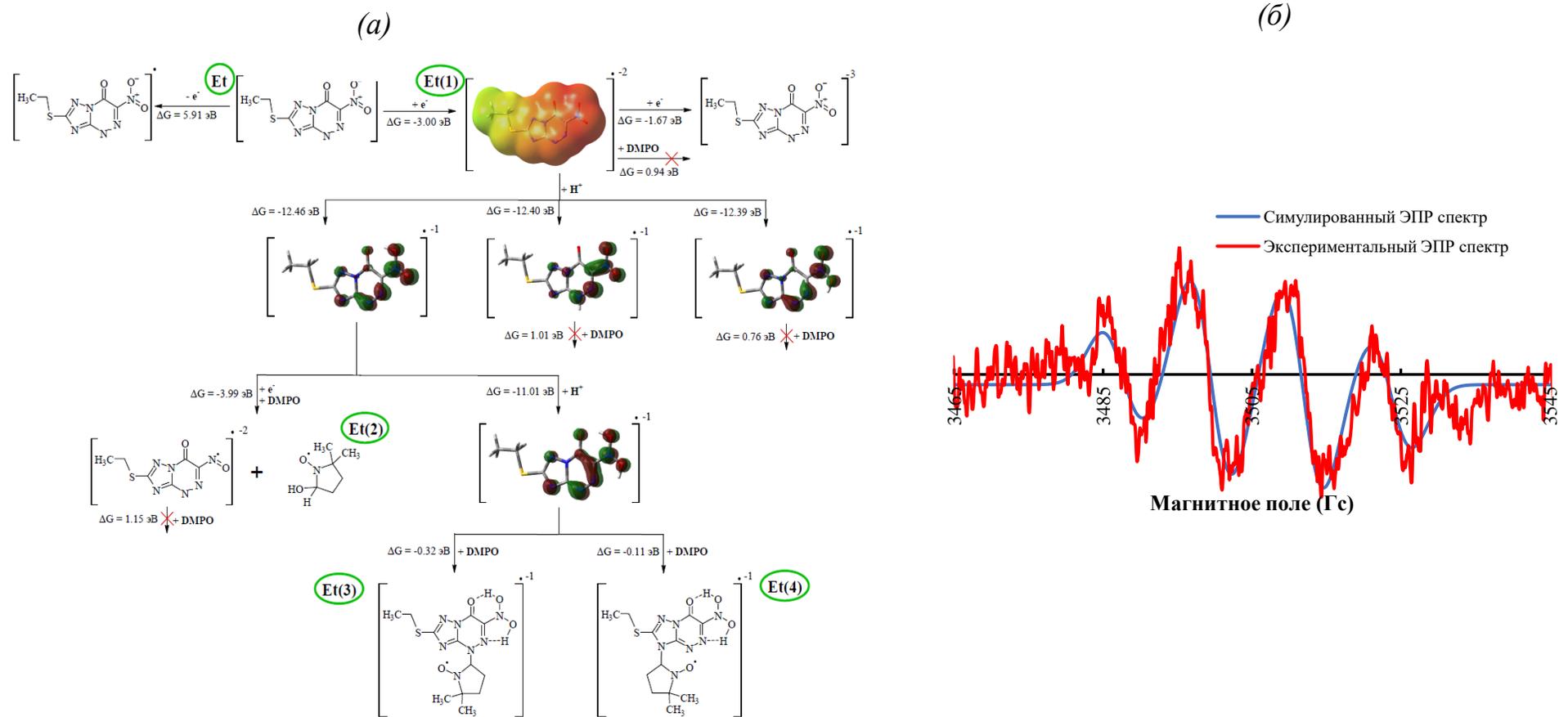


Рисунок 5.6 – Вероятный путь электровосстановления соединения **Et**, (a) в апротонной среде и (б) зарегистрированный ЭПР-спектр аддуктов спиновой ловушки DMPO с продуктами восстановления соединения в ДМФА с совмещенным симулированным ЭПР-спектром предполагаемых аддуктов

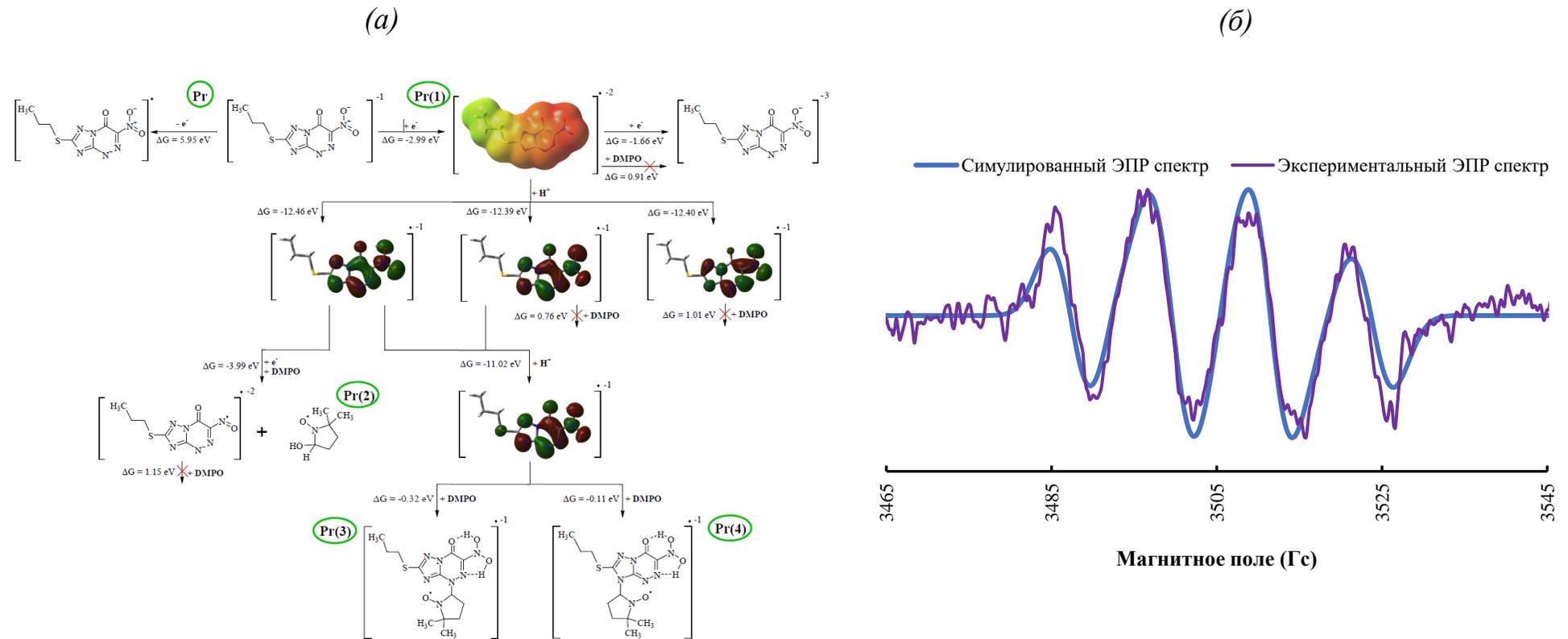


Рисунок 5.7 – Вероятный путь электровосстановления соединения **Pr** (а) в апротонной среде и (б) зарегистрированные ЭПР-спектр аддуктов спиновой ловушки DMPO с продуктами восстановления соединения в ДМФА с совмещенным симулированным ЭПР-спектром предполагаемых аддуктов

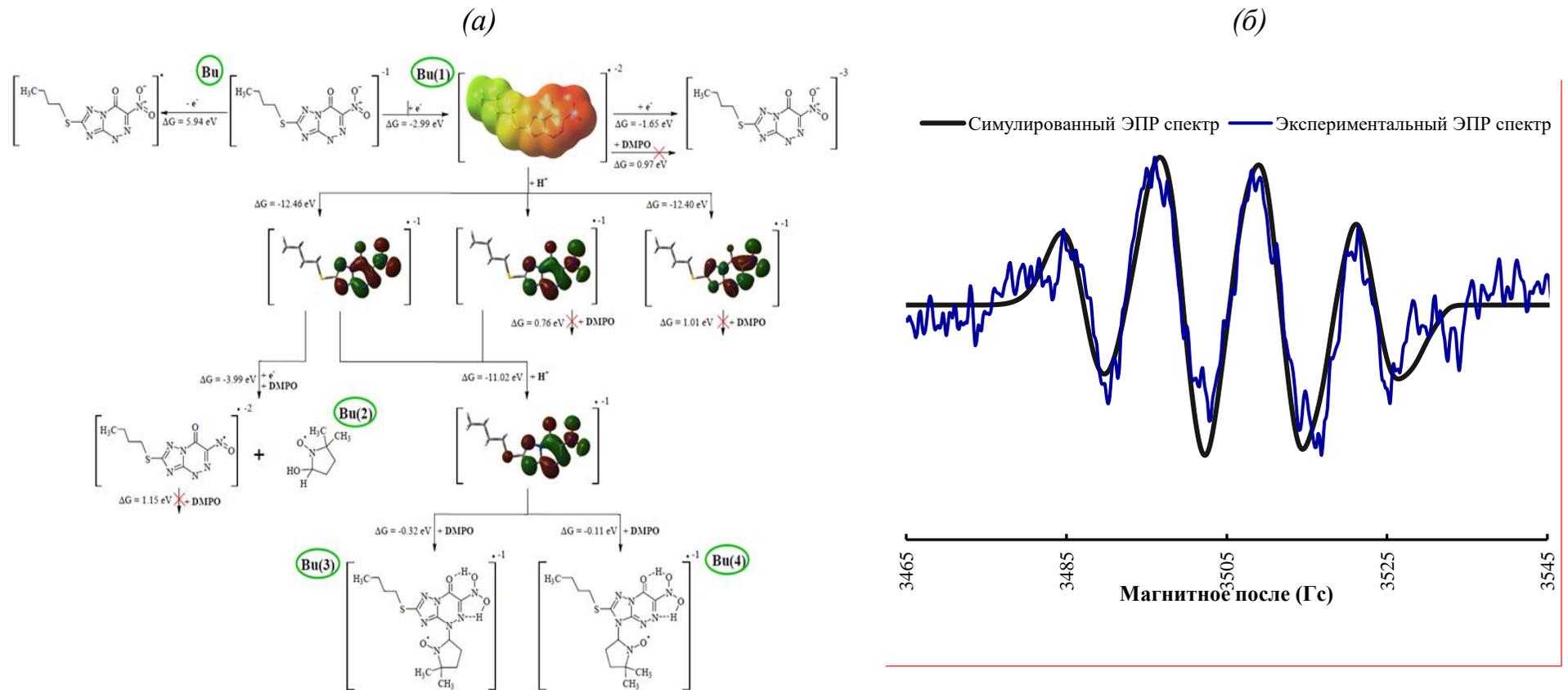


Рисунок 5.8 – Вероятный путь электровосстановления соединения **Bu**, (a) в апротонной среде и (b) зарегистрированный ЭПР-спектр аддуктов спиновой ловушки DMPO с продуктами восстановления соединения в ДМФА с совмещенным симулированным ЭПР-спектром предполагаемых аддуктов

Сравнение вероятных путей электровосстановления соединений **Et**, **Pr**, **Bu** и **TZV** позволяет отметить, что для **всех веществ** характерен одинаковый путь электропревращения в апротонной среде и соотношения аддуктов в смеси. Ранее было выдвинуто предположение об образовании оксимов при электровосстановлении соединения **TZV** [5], что также характерно и для **Pr**, **Bu**. Возможно, как показывают вышеприведенные исследования, для **Et** именно образование оксимов несущественно влияет на лимитирующую стадию процесса, но вносит вклад в образование продуктов радикальной природы. Полученные квантово-химические расчеты также указывают на их образование.

Для глубокого понимания механизма реакции был произведен препаративный электролиз с последующей идентификацией промежуточных и конечных продуктов методом масс-спектроскопией высокого разрешения. Результаты анализов продуктов электросинтеза **Et**, **Pr**, **Bu** позволяют предположить, что восстановление всех соединений протекает благодаря восстановлению нитрогруппы с участием 4-х электронов до образования гидросиламина, что согласуется литературными данными [20, 22].

По данным МСВР, представленным на рисунке 5.9 для **Et**, промежуточными и конечными продуктами реакции также являются соответствующие гидросиламины, амины и продукты конденсации. Такой же набор продуктов характерен и для **Pr** с **Bu**.

Найденные димеры свидетельствуют о радикальном механизме электровосстановления всех соединений. Кроме этого, аналогичные продукты электровосстановления были установлены и для **TZV**, что указывает на схожий путь электровосстановления всех соединений.

Таким образом, электропревращения **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** протекают двухступенчато, необратимо за счет восстановления нитрогруппы с участием четырех электронов на первой стадии. Электровосстановление **всех соединений** происходит в виде протонированных частиц в водной среде, в апротонной среде в виде ионных пар с катионами натрия, через образование частиц радикальной

природы. Общая схема электропревращений **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** представлена на рисунке 5.11.

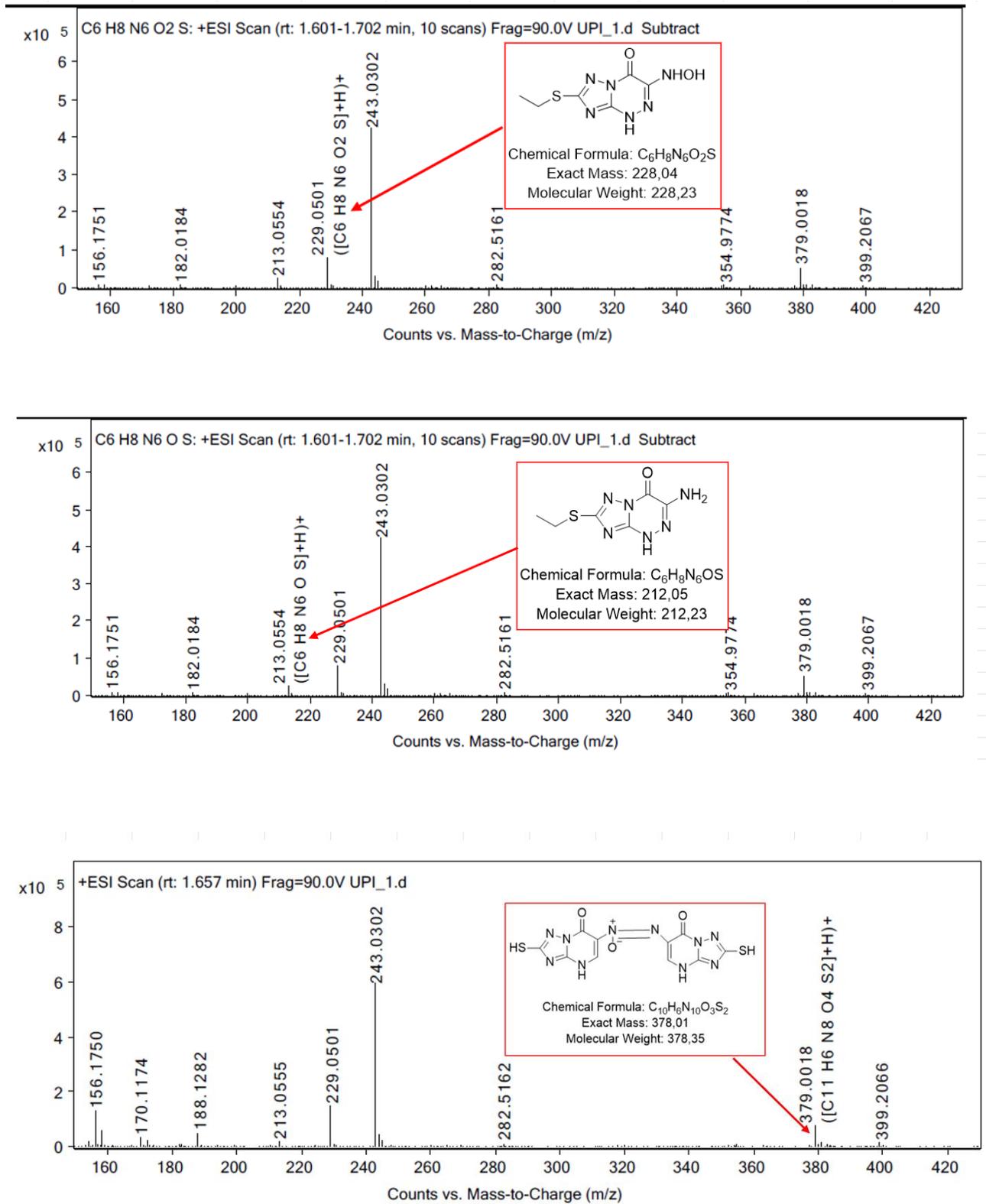


Рисунок 5.10 – Данные МСВР **Et** после электролиза

Исследования по установлению вероятности слияния вируса гриппы А (штамм A/Puerto Rico/8/34, подтип H1N1) с бислойными липидными мембранами после обработки соединениями **TZV**, **Et**, **Pr** показали, что обработка вирусных частиц соединением **Et** приводит к лучшему ингибированию процесса слияния (8,9 %) по сравнению с **Pr** (47,6 %) и ранее исследованными **TZV** (52,9 %) и **TZV-OH** (44,1 %). Последовательность соединений по проценту слияния от наиболее активного к наименее активному выглядит следующим образом **Et** > **TZV-OH** > **Pr** > **TZV**.

Полученные результаты на модельных бислойных липидных мембранах свидетельствуют о способности **TZV** и его производных ингибировать слияние вируса с мембраной клетки хозяина. Это позволяет предположить, что терапевтический эффект соединений обуславливается его взаимодействием с вирусными белками, участвующими в процессе заражения клеток. Одним из основных антигенов современных гриппозных вакцин является белок гемагглютинина [171]. Посредством применения молекулярного докинга показано, что в белке гемагглютинина наиболее прочный контакт *fusion*-пептида (ΔG_{fusion}) с веществом наблюдается у **Et** (5,7 RT). Несколько слабее оказывается связь домена с **TZV** (4,2 RT).

Путем построения карты распределения локализации на атомах положительного или отрицательного заряда **TZV** и **Et** показано, что у **Et** имеется дополнительная локализация отрицательного заряда, находящаяся в тиольном хвосте. Это может быть одной из причин, приводящей к проявлению большей биологической активности.

Суммируя вышесказанное, можно предположить, что **Et**, возможно, будет обладать наибольшей биологической активностью *in vivo*. Вероятно, одной из причин такой активности является структура самого **Et**. Возможно, что наличие именно такой структуры тиольного хвоста оказывает важную роль на аффинность лиганда к *fusion*-пептиду, что, в свою очередь, влияет на процент слияния вещества с вирусом.

Согласно квантово-химическим расчетам, описанным в п 3.3. и 5.2, и экспериментальным данным биофизических процессах на бислойных липидных мембранах, был построен график, представленный на рисунке 5.12.

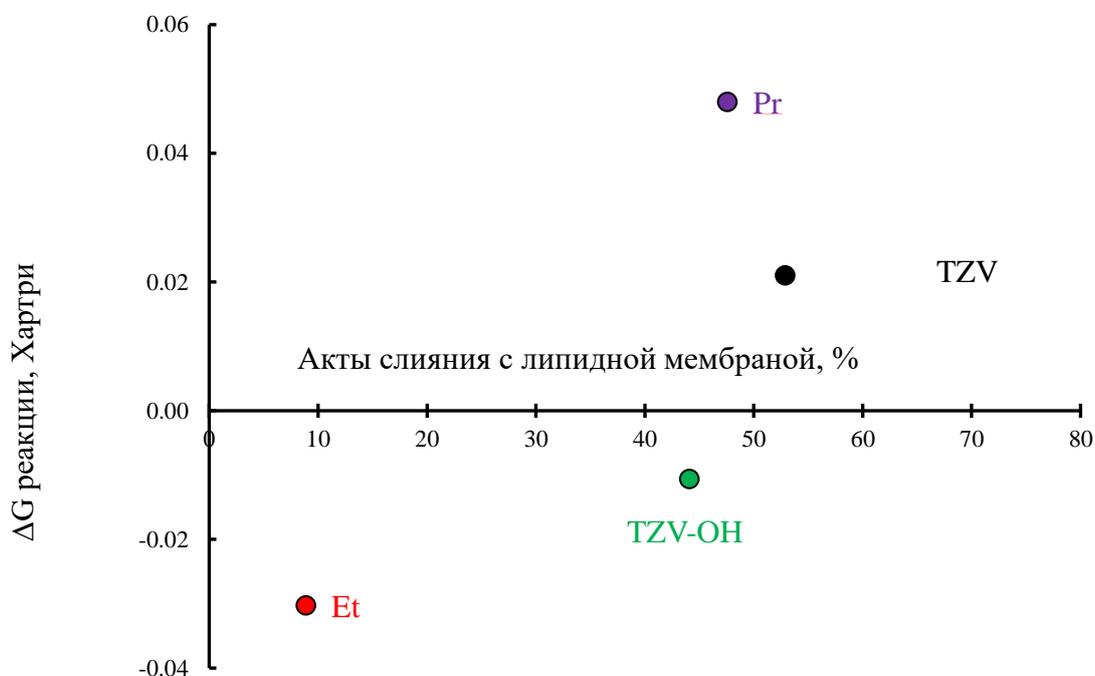


Рисунок 5.12 – Зависимость энергии протонирования анион-радикала молекул соединений (TZV, TZV-OH, Et, Pr,) и депротонирования молекулы от количества актов слияния вируса гриппы А (штамм А/PR/8/34) с бислойными липидными мембранами

Из графика, показывающего корреляцию между полученными экспериментально процентами слияний мембран при предшествующей инкубации вирусов с различными лигандами и расчетными изменениями энергий Гиббса реакции протонирования и депротонирования анион-радикала молекул, можно предположить, что вычисленные теоретически параметры достоверно объясняют экспериментально наблюдаемый результат: чем отрицательнее значение изменения энергии Гиббса реакции, тем более биологически активное соединение.

Выводы к главе 5

1. Рассмотрены электрохимические превращения структурных аналогов натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**TZV**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Bu**). Продемонстрировано, что электровосстановления **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** протекают двухступенчато, необратимо, за счет восстановления нитрогруппы с участием 4-х электронов на первой стадии, через образование анион-радикала до гидроксиламина. Для всех соединений характерен одинаковый набор промежуточных и конечных продуктов, получаемых в ходе электросинтеза соединений.

2. Показано, что несмотря на структурную схожесть соединений, кинетика их электропревращений различна, как и количество образующихся в процессе электровосстановления интермедиатов радикальной природы. Возможно, что именно кинетика электрохимической реакции, неосложненная диффузия, способствует образованию большего числа интермедиатов радикальной природы.

3. Предложены вероятные схемы электровосстановления **TZV**, **Et**, **Pr**, **Bu** в водных средах.

4. Выстроена последовательность, указывающая на возрастание возможной биологической активности **Et** > **TZV-OH** > **Pr** > **TZV**. Молекулярный докинг и молекулярная динамика позволили приблизиться к пониманию высокой реакционной способности **Et**.

5. Показана, корреляция между полученными инструментальными и расчетными методами.

ГЛАВА 6 МЕТОДИКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ

3-НИТРО-4-ОКСО-7-ЭТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с][1,2,4] ТРИАЗИНИДА ДИГИДРАТА

Согласно предположению, описанному в пятой главе, о перспективности и наибольшей биологической активности вещества **Et** становится целесообразно разрабатывать методику количественного определения только на это соединение. Анализ литературных данных первой главы показал необходимость индивидуального подбора рабочих условий и параметров для соединений, являющихся структурными аналогами. При этом, учитывая успешный опыт применения химического удаления кислорода для сокращения времени проведения анализа основного вещества в стандартном образце (описанное в третьей главе), следующим этапом являлся подбор режима и, соответственно, параметров для вольтамперометрического определения **Et** в нейтральной среде.

6.1 Выбор режима для регистрации вольтамперограмм натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата

Предварительная выдержка СУЭ в перемешиваемом ББР с добавлением 100 мг/дм³ соединения **Et** в течение 300 с в интервале потенциалов 1,0–0,1 В, в котором соединение **Et** электрохимически не активно, не приводит к увеличению величины тока/площади под пиком за счет возможной адсорбции аналита на поверхности индикаторного электрода. Это позволяет использовать метод прямой вольтамперометрии для определения соединения **Et** [172].

На рисунке 6.1 приведены ВА соединения **Et**, зарегистрированные на СУЭ в ДИП и КвВ режимах. Сравнение различных вольтамперометрических режимов при одной

и той же скорости сканирования позволяют заключить, что квадратно-волновой режим является предпочтительным для регистрации токов восстановления соединения **Et** в ББР при рН $7,0 \pm 0,1$. В случае КвВ пик более симметричный по сравнению с ДИП-режимом и может быть измерен с высокой точностью. Величина тока пика восстановления в КвВ-режиме в 2,3 раза выше, чем в ДИП. Таким образом, дальнейшие исследования проводили в КвВ-режиме [172].

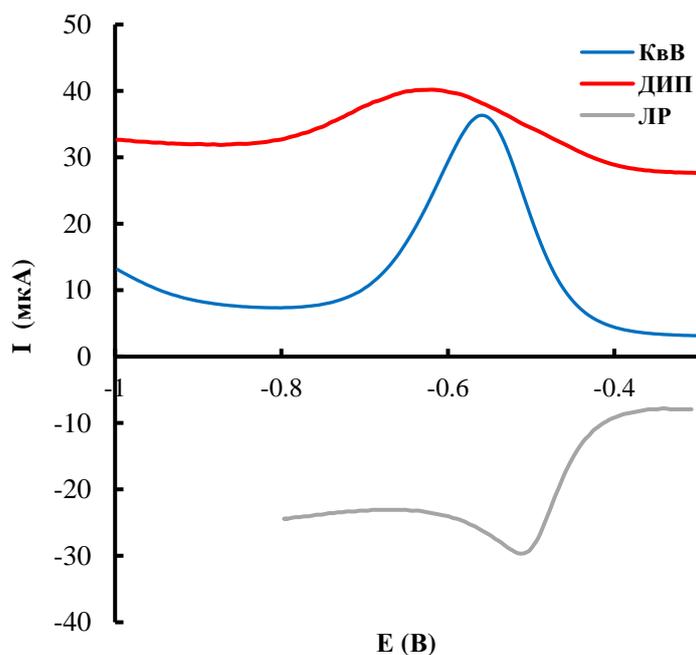


Рисунок 6.1 – Катодные вольтамперограммы соединения **Et** ($C = 250 \text{ мг/дм}^3$), зарегистрированные на СУЭ ($S = 7,065 \text{ мм}^2$) в различных режимах ЛР ($\nu = 0,1 \text{ В/с}$), ДИП ($\nu = 0,01 \text{ В/с}$ и амплитуде $0,06 \text{ В}$) и КвВ ($\nu = 0,15 \text{ В/с}$, амплитуда $0,06 \text{ В}$, частота 35 Гц) в растворе ББР (рН $7,0$) с химическим удалением кислорода

Величина тока пика восстановления/площади пика в режиме КвВ зависит от инструментальных параметров, таких как частота амплитуды, шаг импульса и амплитуда импульса [172].

Зависимость величины тока восстановления соединения **Et** от частоты импульсов при амплитуде импульса $0,05 \text{ В}$ и шаге импульса $0,005 \text{ В}$ линейна в области от 5 до 50 Гц . После дальнейшего увеличения частоты величина тока не возрастает. При этом увеличение сигнала по абсолютной величине в диапазоне частот от 35 до 50 Гц незначительно (не превышает 4%), а отношение полезный

сигнал/остаточный ток снижается почти в два раза, что усложняет регистрацию пика соединения **Et** и ухудшает воспроизводимость полученных результатов. В связи с этим для аналитических целей выбрали частоту 35 Гц [172].

Величина тока восстановления соединения **Et** при частоте импульса 35 Гц, шаге развертки 0,005 В и скорости сканирования 0,1 В/с линейно увеличивается при увеличении амплитуды импульса от 0,02 до 0,05 мВ. Дальнейшее увеличение амплитуды импульса приводит к уменьшению величины тока пика восстановления соединения **Et** [172] (рисунок 6.2, *a*).

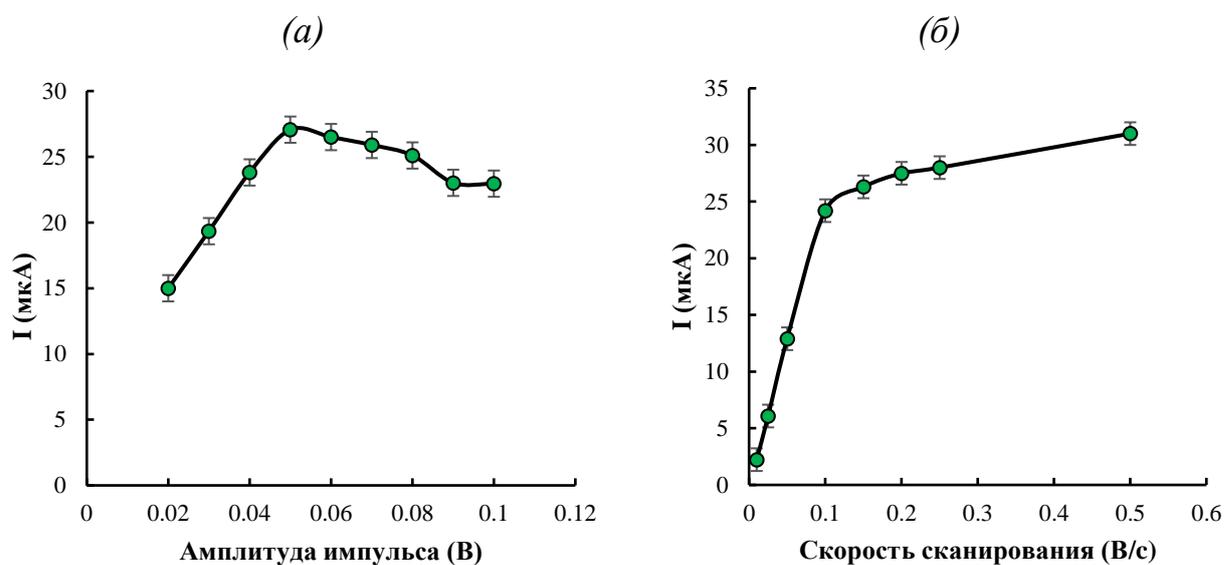


Рисунок 6.2 – Зависимость аналитического сигнала для 250 мг/дм³ соединения **Et** амплитуды импульса (*a*) от скорости сканирования потенциала (*б*), полученные в БР рН 7,0 + 0,04 М Na₂SO₃ с использованием КвВ. Условия регистрации: шаг развертки 0,005 В, амплитуда импульса 0,05 В и скорость сканирования 0,10 В/с

Как видно из рисунка 6.2 (*б*), величина тока восстановления соединения **Et** возрастает в интервале скоростей сканирования от 0,05 до 0,10 В/с, после чего рост замедляется. Для быстроты проведения анализа была выбрана скорость развертки 0,15 В/с. Таким образом, в качестве рабочих условий была выбрана амплитуда импульса 0,05 В, частота импульса 35 Гц, скорость сканирования 0,15 В/с [172].

6.2 Характеристики градуировочного графика для определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата на стеклоуглеродном электроде

При выбранных рабочих условиях регистрации значение величины тока восстановления и площади пика соединения **Et** линейно растут в интервале 10–300 мг/дм³, на что указывает коэффициент корреляции (рисунок 6.3, *а* и *б*). В качестве аналитического сигнала использовали площадь пика восстановления, поскольку повторяемость существенно лучше. На рисунке 6.3 (*в*) приведены соответствующие КвВ вольтамперограммы для разных концентраций соединения **Et** в растворе. Из представленных ВА видно, что пики растут симметрично и имеют высокую величину тока, значение полуширины пика остается постоянным. Все это указывает на правильность выбора параметров для регистрации АС.

Для определения повторяемости разработанной методики была проведена регистрация 10 вольтамперограмм соединения **Et** при концентрации 100 мг/дм³ на одном и том же электроде и растворе. Установлено, что величина тока восстановления имеет значение $1,70 \pm 0,02$ мкКл. Стандартное отклонение составило 2,5 %, что предполагает близкую сходимость результатов [172].

Предел обнаружения, рассчитанный по градуировочной кривой в диапазоне концентрации от 10 до 50 мг/дм³, составляет 1,3 мг/дм³, предел количественного определения 4,0 мг/дм³ (таблица 6.1) [172].

Оценку правильности разработанной методики определения соединения **Et** в стандартном образце определяли методом «введено – найдено» (таблица 6.2). Показатель правильности рассчитывали для уровней концентраций соединения **Et** 100 и 200, 300 мг/ дм³, каждое определение повторяли три раза.

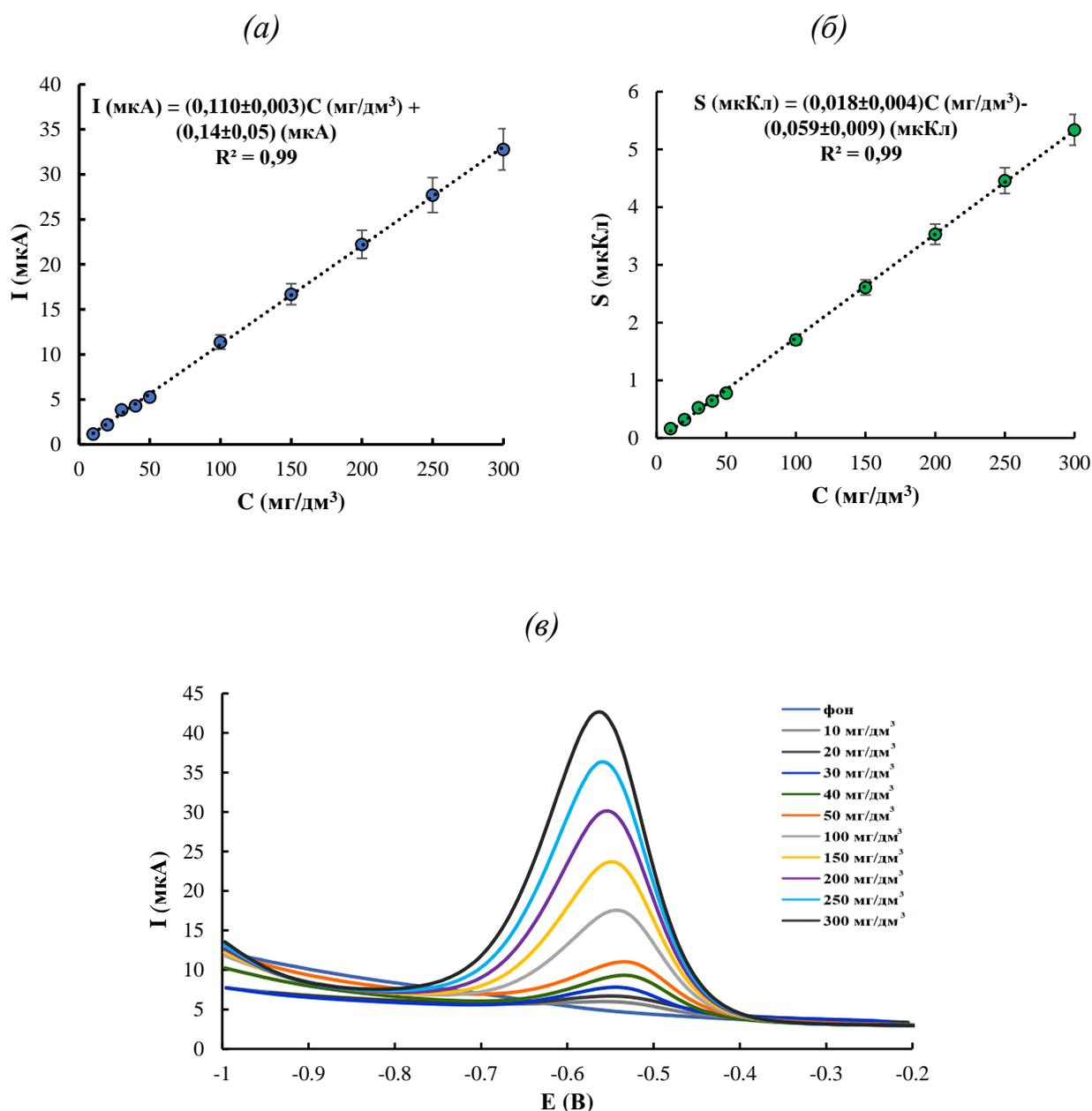


Рисунок 6.3 – Зависимость тока (а) и площади пика (б) восстановления соединения **Et** от его концентрации в ББР рН $7,0 \pm 0,1$ от 10 до 300 мг/дм³ и соответствующие квадратно-волновые вольтамперограммы (в), зарегистрированные на СУЭ ($S = 3,14 \text{ мм}^2$) со скоростью сканирования потенциала 0,15 В/с, амплитудой импульса 50 мВ и частотой 35 Гц ($n = 5, P = 0,95$)

Показатель правильности для различных уровней концентраций близок к 100 %. Среднее значение степени открытия (R) составило $96,8 \pm 3,7$. Доверительный интервал среднего результата анализа включает значение 100 %. Значение относительного стандартного отклонения составило 3,6 %.

Таблица 6.1 – Расчет ПО для **Et** в ББР рН 7,0 на СУЭ с химическим удалением кислорода

Характеристика	Значение
Диапазон концентрации	10–50 мг/дм ³
Уравнение прямой	S (мкКл) = $(0,015 \pm 0,001) c$ (мг/дм ³) + $(0,020 \pm 0,006)$ (мкКл)
Коэффициент корреляции	0,99
ПО, мг/дм ³	1,3
ПКО, мг/дм ³	4,0

Таблица 6.2 – Оценка правильности методики по методу «введено – найдено» для 100,0, 200,0, 300,0 мг/дм³ **Et** в ББР рН 7,0 на СУЭ ($n = 9$, $P = 0,95$)

Параметры	C_{Et} , мг/дм ³			$R_{cp} \pm \Delta R$, %	СО	RSD, %
	100,0	200,0	300,0			
R , %	103,1	100,3	98,4	97,9 ± 5,2	2,9	3,2
	98,3	96,1	95,4			
	97,8	94,5	94,8			

Одним из способов сокращения времени на проведение количественного определения основного вещества в объектах фармации является использование толстопленочных углеродсодержащих электродов, которые имеют ряд преимуществ перед стеклоуглеродным. Кроме того, использование ТУЭ позволяет автоматизировать и миниатюризировать процесс анализа. Поэтому следующим этапом является подбор материала для толстопленочного углеродсодержащего электрода.

6.3 Выбор материала для толстопленочного углеродсодержащего электрода

Вольтамперограммы соединения **Et** были зарегистрированы в КВВ-режиме с химическим способом удаления кислорода в соответствии с параметрами, подобранными для определения соединения **Et** на СУЭ. Сравнение величины, формы и воспроизводимости АС соединения **Et** для разных электродов (таблица 6.3) показали, что наибольшая величина и лучшая воспроизводимость достигается при использовании ТУЭ Electrodag PF-407С.

Таблица 6.3 – Сравнение АС соединения **Et** для разных электродов, зарегистрированных в растворе ББР pH 7,0 + 50, 250, 500 мг/дм³ соединения **Et** в КВВ-режиме при $\nu = 0,1$ В/с, шаге развертки – 0,005В, амплитуде импульса – 0,05В и частоте – 35 Гц ($n = 18$, $P = 0,95$)

Паста	Соединения Et , мг/дм ³	I_{cp} , мкА	E_{cp} , В	Полуширина пика, В	Площадь под пиком, мкКл
Carbon Paste	50	13,1 ± 1,9	-0,50	0,128	1,76±0,28
	250	21,1± 4,5	-0,56	0,214	4,7±0,3
	500	16,2 ± 1,7	-0,58	0,230	4,0±0,8
Carbon Paste (Heavy Metal Detection)	50	3,2 ± 2,9	-0,56	0,168	0,6±0,2
	250	9,0 ± 2,9	-0,61	0,240	2,3±0,7
	500	9,7 ± 3,3	-0,57	0,203	2,1±0,7
Electrodag PF- 407С	50	13,1 ± 1,4	-0,64	0,204	2,6±0,3
	250	46,6 ± 1,2	-0,67	0,205	10,8±1,8
	500	67,3 ± 2,4	-0,70	0,207	18,3±2,3

В этом случае величина тока восстановления исследуемого вещества выше примерно в два раза по сравнению с Carbon Paste, примерно в четыре с половиной раза – по сравнению с Carbon Paste (Heavy Metal Detection). На рисунке 6.4 показаны ВА, зарегистрированные в выбранных условиях и на ТУЭ из различных паст. Из рисунка следует, что ВА, полученные на ТУЭ Electrodag PF-407С, имеют четкий, симметричный, выраженный сигнал, более того, линия остаточного тока близка к 0. В связи с вышесказанным ТУЭ Electrodag PF-407С был выбран в качестве рабочего.

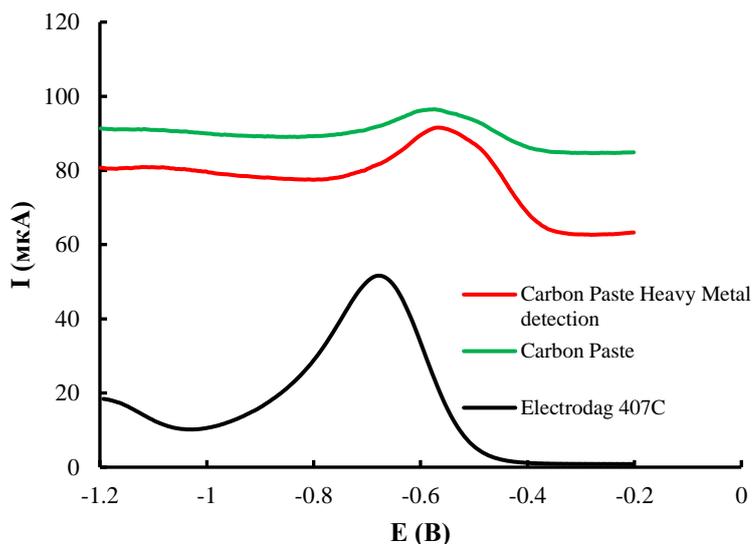


Рисунок 6.4 – Квадратно-волновые вольтамперограммы соединения **Et** ($C = 250 \text{ мг/дм}^3$), зарегистрированные на ТУЭ ($S = 12,5 \text{ мм}^2$) при частоте импульса 35 Гц и амплитуде импульса 0,05 В в ББР рН $7,0 \pm 0,1$ с химическим удалением кислорода: красная линия – Carbon Paste (Heavy Metal Detection), зеленая – Carbon Paste, черная – Electrodag PF-407C

6.4 Характеристики градуировочного графика для определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата на толстопленочном электрохимическом электроде

На основании выбранных ранее рабочих условиях и типа электрода были зарегистрированы ВА в диапазоне концентрации исследуемого вещества от 10 до 500 мг/дм^3 (рисунок 6.5). При рабочих условиях регистрации значение величины тока восстановления и площадь пика соединения **Et** линейно растут в интервале $10\text{--}500 \text{ мг/дм}^3$, на что указывает коэффициент корреляции (рисунок 6.5, *а* и *б*). На рисунке 6.6 (*в*) приведены соответствующие КвВ вольтамперограммы для разных концентраций соединения **Et** в растворе. Из представленных ВА видно, что пики растут симметрично и имеют высокую величину тока, значение полуширины пика остается постоянным. Все это указывает на правильность выбора параметров для регистрации АС.

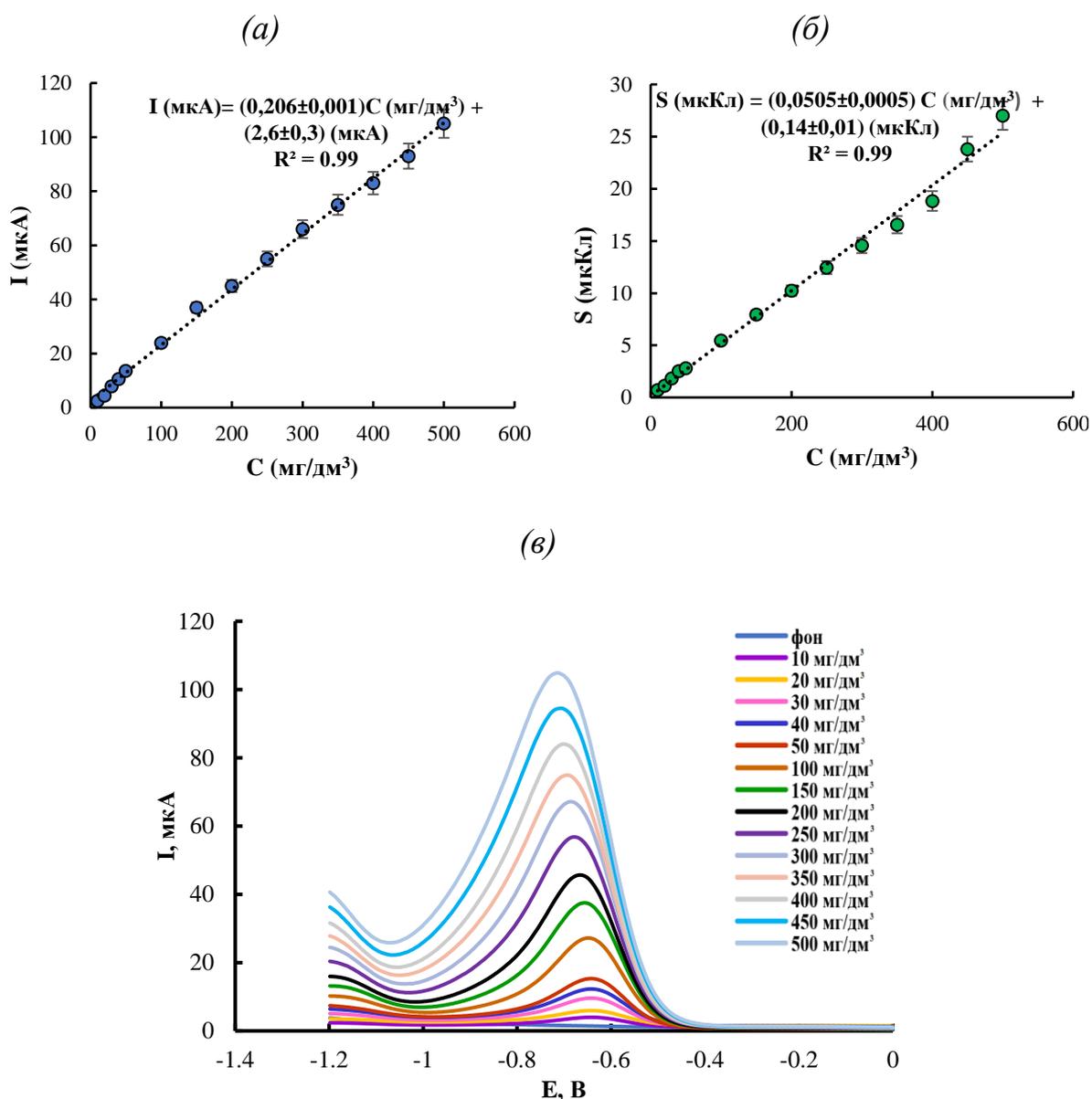


Рисунок 6.5 – Зависимость тока(а) и площади пика(б) восстановления соединения **Et** от его концентрации в ББР pH $7,0 \pm 0,1$ от 10 до $500 \text{ mg}/\text{dm}^3$ соединения **Et** и соответствующие КВВ вольтамперограммы (в), зарегистрированные на ТУЭ со скоростью развертки потенциала $0,1 \text{ V}/\text{с}$, амплитудой импульса 50 mV и частотой 35 Гц ($n = 5, p = 0,95$)

Предел обнаружения, рассчитанный по градуировочной кривой в диапазоне концентрации от 10 до $50 \text{ mg}/\text{dm}^3$, составляет $1,2 \text{ mg}/\text{dm}^3$, предел количественного определения – $3,6 \text{ mg}/\text{dm}^3$ (таблица 6.4). Показатель правильности рассчитывали для уровней концентраций соединения **Et** $100, 250, 500 \text{ mg}/\text{dm}^3$ по методу «введено – найдено», каждое определение повторяли три раза (таблица 6.5).

Таблица 6.4 – Расчет ПО для **Et** в ББР pH 7,0 на ТУЭ/Electrodag PF-407C с химическим удалением кислорода ($n = 9, P = 0,95$)

Характеристика	Значение
Диапазон концентрации	10–50 мг/дм ³
Уравнение прямой	I (мкА) = $(0,206 \pm 0,001) c$ (мг/дм ³) + $(2,62 \pm 0,31)$ (мкА)
Коэффициент корреляции	0,99
ПО, мг/дм ³	1,2
ПКО, мг/дм ³	3,6

Показатель правильности для различных уровней концентраций близок к 100 %. Среднее значение степени извлечения составило $98,8 \pm 2,7\%$. Доверительный интервал среднего результата анализа включает значение 100 %. Значение стандартного отклонения составило 2,7, а относительного стандартного отклонения – 2,8 %. Данные представлены в таблице 6.4.

Таблица 6.5 – Результаты определения соединения **Et** методом «введено – найдено» на ТУЭ Electrodag PF-407C

Параметры	C_{Et}, мг/дм³			$R_{cp} \pm \Delta R$, %	CO	RSD, %
	100,0	200,0	300,0			
R, %	97,5	100,9	99,2	98,8 ± 2,7	2,7	2,8
	97,7	101,4	97,8			
	97,9	100,6	98,3			

6.5 Сравнительная характеристика электродов для определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата

В таблице 6.6 приведены статистические характеристики для двух типов электродов: СУЭ и ТУЭ (Electrodag PF-407С). Сравнение характеристик методик вольтамперометрического определения **Et** на СУЭ и ТУЭ показало, что существенных различий по аналитическим характеристикам между электродами СУЭ и ТУЭ не наблюдалось. При этом использование ТУЭ может стать преимуществом, поскольку позволяет увеличить диапазон определяемых концентрации, т. к. концентрация основного вещества в лекарственных формах в некоторых случаях составляет 500 мг/дм³, и облегчить проведение рутинного анализа на производстве.

Таблица 6.6 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости

Аналитические характеристики	СУЭ	ТУЭ Electrodag PF-407С
Диапазон концентрации, мг/дм ³	0–300	0–500
Коэффициент корреляции	0,99	0,99
ПО, мг/дм ³	1,3	1,2
ПКО, мг/дм ³	4,0	3,6

Выводы к главе 6

1 Разработан способ количественного определения 3-нитро-4-окси-7-этилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата с химическим удалением и применения в качестве рабочего электрода ТУЭ.

2 Область линейности градуировочного графика с использованием разработанного способа для ТУЭ составляет 10–500 мг/дм³. Предел обнаружения составляет 1,2 мг/дм³, а предел количественного определения составил 3,6 мг/дм³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках выполненной работы получены следующие результаты:

1. Показано, что необратимое четырехэлектронное восстановление натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Et**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-пропилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Pr**), натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-бутилтио-[1,2,4]триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазиныда дигидрата (**Bu**) протекает в две ступени, а у натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныда моногидрата (**TZV-OH**) – в одну, через образование анион-радикалов до гидроксиламинов, аминов и продуктов димерного строения. Электровосстановление **всех соединений** происходит в виде протонированных частиц в водной среде, в апротонной среде в виде ионных пар с катионами натрия.

2. Показано, что, несмотря на структурную схожесть соединений, кинетика их электропревращений различна: для **Et** и **TZV-OH** реакция лимитируется диффузией, у **Pr**, **Bu** – диффузией, осложненной предшествующей химической реакцией. Установлено наибольшее количество интермедиатов радикальной природы, образующихся в процессе электровосстановления, у **Et** и **TZV-OH**. Согласно расчетным данным, **TZV-OH** требуется на одну стадию протонирования анион-радикала больше, чем для **Et**, **Pr**, **Bu**. По результатам вирусного слияния с модельными липидными мембранами *in vitro* выстроена последовательность, указывающая на возрастание возможной биологической активности **Et** > **TZV-OH** > **Pr**.

3. Предложен комплексный подход, включающий инструментальные и расчетные методы для исследования соединений из ряда натриевых солей 3-нитро-4-**X-7R**-тио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазиныдов инструментальными и расчетными методами. Показано, что диффузионный характер кинетики электродной реакции приводит к образованию большего количества интермедиатов радикальной природы, что, вероятно, является одной из причин, обуславливающей большую

биофизическую активность соединений. Выделены два «соединения – лидера» – натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата (**Et**) и натриевая соль 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата (**TZV-ОН**).

4. Разработана методика вольтамперометрического определения **TZV-ОН** в условиях химического удаления кислорода в растворе с нейтральным рН среды на стеклоуглеродном электроде с использованием режима прямой квадратно-волновой вольтамперометрии в диапазоне концентраций 10–300 мг/дм³ с пределом обнаружения –1,7 мг/дм³ и пределом количественного определения – 5,2 мг/дм³. В рамках выбранного диапазона была оценена правильность разработанной методики.

5. Разработана методика вольтамперометрического определения **Et** в условиях химического удаления кислорода в растворе с нейтральным рН среды на толсто пленочном углеродсодержащем электроде с использованием режима прямой квадратно-волновой вольтамперометрии в диапазоне концентраций 10 – 500 мг/дм³ с пределом обнаружения – 1,2 мг/дм³ и предел количественного определения – 3,6 мг/дм³. В рамках выбранного диапазона была оценена правильность разработанной методики.

Перспективы дальнейшей разработки темы в указанном научном направлении связаны с расширением веществ азолазинового ряда, различающихся структурно заместителями/противоионами и т. д., и установления взаимосвязи «структура – физико-химические свойства – возможная противовирусная активность». Апробация предложенного комплексного подхода на представленных молекулах позволит определить параметры для создания программы нейронной сети, позволяющей провести оценку возможной активности молекул до стадии их испытания *in vitro* на клеточных линиях. Дальнейшее исследование включает: расширение круга изучаемых объектов и нозологию, с целью создания единой методологии комплексного исследования веществ для поиска «соединения – лидера» и разработок методик их количественного определения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

@ – модификация/покрытие;

DMPO – 3,5,5-диметил-1-пирролин N-оксид;

E_{red} – потенциал восстановления;

I_a – величина анодного тока;

I_c – величина катодного тока;

n_e – количество электронов;

S – чувствительность;

ТМТН – N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид гидрохлорид;

α – коэффициент переноса электронов;

v – скорость развертки;

σ – стандартное отклонение аналитического сигнала;

АС – аналитический сигнал;

ББР – Буферный раствор Бриттона – Робинсона;

ВА – вольтамперограммы;

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография;

ДИП – дифференциально-импульсная вольтамперометрия;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДМФА – N,N-Диметилформаид;

ЖХ-МС – жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией;

ИВА – инверсионная вольтамперометрия;

КвВ – квадратно-волновая вольтамперометрия;

ЛР – линейный режим регистрации;

ЛС – лекарственное средство;

МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения;

ПКО – предел количественного определения;

ПО – предел обнаружения;

СУЭ – стеклоуглеродный электрод;

Bu_4NBF_4 – тетрабутиламмоний тетрафторборат;

ТГФ – тетрагидрофуран;

ТУЭ – толстопленочные углеродсодержащие электроды;

УФ/ВИД – ультрафиолетовая и видимая область;

ХА – хроноамперометрия;

ЦВА – циклическая вольтамперометрия;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

ЭХМИ – электрохимические методы исследования;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Squella, J. A. Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance / J. A. Squella, S. Bollo, L. J. Núñez-Vergara // *Current Organic Chemistry*. – 2005. – Vol. 9. – Is. 6. – P. 565–581.
2. Enhancing anticancer activity through the combination of bioreducing agents and triterpenes / B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, T. Jarosz [et al.] // *Future Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 10. – Is. 5. – P. 511–525.
3. Study on redox properties and cytotoxicity of anthraquinone derivatives to understand antitumor active anthracycline substances / N. Okumura, H. Mizutani, T. Ishihama [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2019. – T. 67. – №. 7. – C. 717–720.
4. Čėnas, N. Single-and two-electron reduction of nitroaromatic compounds by flavoenzymes: Mechanisms and implications for cytotoxicity / N. Čėnas, A. Nemeikaitė-Čėnienė, L. Kosychova // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22. – Is. 16. – P. 8534.
5. Redox conversions of new antiviral drug Triazavirin®: Electrochemical study and ESR spectroscopy / A. V. Ivoilova, L. V. Mikhal'chenko, A.N. Tsmokalyuk [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2021. – Vol. 70. – P. 1099–1108.
6. Redox Conversions of 5-Methyl-6-nitro-7-oxo-4, 7-dihydro-1, 2, 4triazolo [1, 5-a] pyrimidinide L-Arginine Monohydrate as a Promising Antiviral Drug / A. V. Ivoilova, L. V. Mikhal'chenko, A. N. Tsmokalyuk [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – Is. 16. – Article 5087.
7. Kedderis, G. L. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents / G. L. Kedderis, G. T. Miwa // *Drug metabolism reviews*. – 1988. – Vol. 19. – Is. 1. – P. 33–62.
8. Wardman, P. Application of pulse radiolysis methods to study the reactions and structure of biomolecules / P. Wardman // *Reports on Progress in Physics*. – 1978. – Vol. 41. – Is. 2. – P. 259.

9. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles / C. Viodé, N. Bettache, N. Cenas [et al.] // *Biochemical pharmacology*. – 1999. – Vol. 57. – Is. 5. – P. 549–557.
10. Nitroradical Anion Formation from some Iodo-Substituted Nitroimidazoles / S. Bollo, L. J. Núñez-Vergara, C. Barrientos [et al.] // *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. – 2005. – Vol. 17. – Is. 18. – P. 1665–1673.
11. Page, J. E. Polarographic Behavior of Aromatic Nitro Compounds. I. Mononitro Compounds / J. E. Page, J. W. Smith, J. G. Waller // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1949. – Vol. 53. – Is. 4. – P. 545–562.
12. Nassif, S. Studying the effect of substituent on the electrochemical reduction of nitrobenzene and its Derivatives / S. Nassif, R. Madwar, D. Bakeer // *Chemistry and Materials Research*. – 2015. – Vol. 7. – P. 63–68.
13. Stradins, J. Peculiarities of electrochemical reduction of aromatic nitro compounds on short-period dropping mercury electrodes / J. Stradins, I. Kravis // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1975. – Vol. 65. – Is. 2. – P. 635–649.
14. Electrochemistry in ordered systems. 2. Electrochemical and spectroscopic examination of the interactions between nitrobenzene and anionic, cationic, and nonionic micelles / G. L. McIntire, D. M. Chiappardi, R. L. Casselberry [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1982. – Vol. 86. – Is. 14. – P. 2632–2640.
15. Electroréduction de dérivés dinitrés aromatiques—II. Influence des tensio-actifs sur les conditions d'adsorption et les paramètres électrochimiques de réduction du 4, 4'-dinitrodibenzyle en milieu hydroalcoolique / V. Danciu, A. M. Martre, P. Pouillen, [et al.] // *Electrochimica acta*. – 1992. – Vol. 37. – Is. 11. – P. 2001–2008.
16. Heyrovský, M. Das auftreten von parallelen elektrodenreaktionen in der polarographischen reduktion von nitrobenzol in sauren medien / M. Heyrovský, S. Vavříčka // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1970. – Vol. 28. – Is. 2. – P. 409–420.
17. Karakus, C. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds Part 9. Substituent effects on protonation of the radical

ArNO₂H· and its reactions with hydroxylamino and nitroso compounds in buffered mixtures of water and DMF / C. Karakus, P. Zuman // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1995. – Vol. 396. – Is. 1–2. – P. 499–505.

18. Zuman, P. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic nitro compounds: Part VIII. Effects of solvents and surfactants on current–voltage curves obtained with DC and differential pulse polarography / P. Zuman, E. Rupp // *Electroanalysis*. – 1995. – Vol. 7. – Is. 2. – P. 132–137.

19. Pezzatini, G. Double-layer structure and mechanism of electrode reactions: Part II. Nitrobenzene reduction on mercury from aqueous solutions / G. Pezzatini, R. Guidelli // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1979. – Vol. 102. – Is. 34(3). – P. 205–219.

20. Sadek, H. Polarography of nitrobenzene in aqueous solutions and in water-alcohol mixtures / H. Sadek, B. A. Abd-El-Nabey // *Electrochimica Acta*. – 1972. – Vol. 17. – Is. 11. – P. 2065–2075.

21. Pouillen, P. Reduction electrochimique du nitrobenzene, en milieu micellaire aqueux, a divers pH. Influence de la nature des tensio-actifs / P. Pouillen, A. M. Martre, P. Martinet // *Electrochimica Acta*. – 1982. – Vol. 27. – Is. 7. – P. 853–860.

22. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, part I: General mechanistic aspects / P. Zuman, Z. Fijalek, D. Dumanovic [et al.] // *Electroanalysis*. – 1992. – Vol. 4. – Is. 8. – P. 783–794.

23. Zuman, P. Contribution to the understanding of the reduction mechanism of nitrobenzene / P. Zuman, Z. Fijalek // *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. – 1990. – Vol. 296. – Is. 2. – P. 583–588.

24. Smith, W. H. Electrochemical reactions of organic compounds in liquid ammonia. II. Nitrobenzene and nitrosobenzene / W. H. Smith, A. J. Bard // *Journal of the American Chemical Society*. – 1975. – Vol. 97. – Is. 18. – P. 5203–5210.

25. Integrated study of the dinitrobenzene electroreduction mechanism by electroanalytical and computational methods / A. S. Mendkovich, M. A. Syroeshkin, L. V. Mikhalchenko [et al.] // *International Journal of Electrochemistry*. – 2011. – Article 346043.

26. Reduction potentials in relation to physiological activities of benzenoid and heterocyclic nitroso compounds: Comparison with the nitro precursors / P. Kovacic, M. A. Kassel, B. A. Feinberg [et al.] // *Bioorganic Chemistry*. – 1990. – Vol. 18. – Is. 3. – P. 265–275.
27. Electrochemical reduction of C-4 nitrosophenyl 1, 4-dihydropyridines and their parent C-4 nitrophenyl derivatives in protic media / L. J. Núñez-Vergara, P. Santander, P. A. Navarrete-Encina [et al.] // *Journal of electroanalytical chemistry*. – 2005. – Vol. 580. – Is. 1. – P. 135–144.
28. Guilbaudcriqui, A. Flow cell electrosynthesis of ortho-substituted nitrosobenzenes - insitu reaction with sulfinic acids - attempt to prepare heterocycles / A. Guilbaudcriqui, C. Moinet // *ChemInform*. – 1992. – Vol. 129. – Is. 3. – P. 295–300.
29. Rubinstein, I. Voltammetric study of nitrobenzene and related compounds on solid electrodes in aqueous solution / I. Rubinstein // *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. – 1985. – Vol. 183. – Is. 1–2. – P. 379–386.
30. Voltammetric studies of aromatic nitro compounds: pH-dependence on decay of the nitro radical anion in mixed media / J. Carbajo, S. Bollo, L. J. Núñez-Vergara [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 494. – Is. 1. – P. 69–76.
31. Abreu, F. C. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties / F. C. de Abreu, P. A. L. De Ferraz, M. O. F. Goulart // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2002. – Vol. 13. – P. 19–35.
32. Electrochemical behavior and voltammetric determination of some nitro-substituted benzamide compounds / O. Saglam, F. Comert Onder, T. Gungor, M. A. Y. Dilgin // *Turkish Journal of Chemistry*. – 2018. – Vol. 42. – Is. 3. – P. 780–793.
33. Electrochemical characterization of para-and meta-nitro substituents in aqueous media of new antichagasic pharmaceutical leaders / C. G. Sanz, K. A. Dias, R. P. Bacil [et al.] // *Electrochimica Acta*. – 2021. – Vol. 368. – Article 137582.
34. Kuhn, A. Reduction potentials of para-substituted nitrobenzenes—an infrared, nuclear magnetic resonance, and density functional theory study / A. Kuhn, K.

G. Von Eschwege, J. Conradie // *Journal of Physical Organic Chemistry*. – 2012. – Vol. 25. – Is. 1. – P. 58–68.

35. Shalev, H. Solvation of anion radicals: gas-phase versus solution / H. Shalev, D. H. Evans // *Journal of the American Chemical Society*. – 1989. – Vol. 111. – Is. 7. – P. 2667–2674.

36. Geske, D. H. Electrochemical generation of free radicals and their study by electron spin resonance spectroscopy; the nitrobenzene anion radical / D. H. Geske, A. H. Maki // *Journal of the American Chemical Society*. – 1960. – Vol. 82. – Is. 11. – P. 2671–2676.

37. Study of Steric Effects by Electron Spin Resonance Spectroscopy and Polarography. Substituted Nitrobenzenes and Nitroanilines / D. H. Geske, J. L. Ragle, M. A. Bambenek, A. L. Balch // *Journal of the American Chemical Society*. – 1964. – Vol. 86. – Is. 6. – P. 987–1002.

38. Jensen, B. S. Reactions of Aromatic Anion Radicals and Dianions. Part III. Electrolyte and Solvent Effects on the Kinetics of Electron Transfers to Cyclooctatetraenes / B. S. Jensen, A. Ronlan, V. D. Parker // *Acta Chemica Scandinavica B*. – 1975. – Vol. 29. – Is. 3. – P. 394–403.

39. Kemula, W. Electrochemical behaviour of nitrosobenzene in dimethylformamide / W. Kemula, R. Sioda // *Journal of Electroanalytical Chemistry (1959)*. – 1963. – Vol. 6. – Is. 3. – P. 183–186.

40. Sioda, R. Application of the flow electrolytic method to the study of optical absorption spectra of the radical anions of nitrobenzene, p-nitrotoluene and anthraquinone / R. E. Sioda, W. Kemula // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1971. – Vol. 31. – Is. 1. – P. 113–117.

41. Kemula, W. Electrochemical generation and visible spectrum of nitrobenzene free radical anion in dimethylformamide / W. Kemula, R. Sioda // *Nature*. – 1963. – Vol. 197. – Is. 4867. – P. 588–589.

42. Kwiatek, B. Electrochemical reduction of substituted nitrobenzenes in N, N-dimethylformamide containing proton donating agents: Effect of the double layer on the

basicity of the nitro group / B. Kwiatek, M. K. Kalinowski // *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. – 1987. – Vol. 226. – Is. 1–2. – P. 61–67.

43. Bock, H. Die elektrochemische Reduktion aromatischer Nitro-Verbindungen in aprotischer Lösung / H. Bock, U. Lechner-Knoblauch // *Naturforsch.* – 1985. – Vol. 40b. – P. 1463–1475.

44. Kemula, W. Investigation of the electrochemical generation and the visible spectra of free radical anions of the mono-nitro-naphthalenes and nitromesitylene, in dimethylformamide / W. Kemula, R. Sioda // *Journal of Electroanalytical Chemistry* (1959). – 1964. – Vol. 7. – Is. 3. – P. 233–241.

45. Electrochemically controlled hydrogen bonding. Nitrobenzenes as simple redox-dependent receptors for arylureas / J. Bu, N. D. Lilienthal, J. E. Woods [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – Is. 17. – P. 6423–6429.

46. Mendkovich, A. S. Protonation of 1, 3-and 1, 4-dinitrobenzene dianions / A. S. Mendkovich, L. V. Mikhalchenko, A. I. Rusakov [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1492–1495.

47. Jannakoudakis, P. D. Reduktion der Dinitrobenzole an Kohlenstoff-Faser-Elektroden in sauren und alkalischen wäßrig-methanolischen Lösungen / P. D. Jannakoudakis, E. Theodoridou // *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. – 1982. – Vol. 130. – Is. 1. – P. 49–62.

48. Sagae, H. Oxidation of nitroalkylbenzene with electro-generated superoxide ion / H. Sagae, M. Fujihira, T. Osa // *Chemistry Letters*. – 1977. – Vol. 6. – Is. 7. – P. 793–796.

49. Reduction mechanism of 4-nitrobenzophenone in tetrahydrofuran. Influence of added proton donors / J. C. Gard, Y. Mugnier, Y. Huang [et al.] // *Canadian journal of chemistry*. – 1993. – Vol. 71. – Is. 3. – P. 325–330.

50. Electroreduction mechanism of N-arylhydroxylamines in aprotic solvents: N-(4-nitrophenyl) hydroxylamine / A. S. Mendkovich, M. A. Syroeshkin, D. V. Ranchina [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 728. – P. 60–65.

51. Integrated study of the dinitrobenzene electroreduction mechanism by electroanalytical and computational methods / A. S. Mendkovich, M.A. Syroeshkin, L. V.

Mikhalchenko [et al.] // International Journal of Electrochemistry. – 2011. – Vol. 2011. Article 346043.

52. Electrochemical, ESR and quantum chemical study of 1-substituted naphthalenes and their radical anions / N. V. Vasilieva, I. G. Irtegov, T. A. Vaganova [et al.] // Journal of Physical Organic Chemistry. – 2008. – Vol. 21. – Is. 1. – P. 73–78.

53. Kemula, W. The visible spectra of the free radical anions of α - and β -nitronaphthalenes in dimethylformamide / W. Kemula, R. Sioda // Naturwissenschaften–1963. – Vol. 50. – P. 708–709.

54. Krygowski, T. M. Polarographic and voltammetric study of mono-nitro derivatives of benzenoid hydrocarbons in DMF-interpretation within hammett-streitwieser equation and HMO-theory / T. M. Krygowski, M. Stencel, Z. Galus // Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. – 1972. – Vol. 39. – Is. 2. – P. 395–405.

55. Voltammetric reduction of 4-nitroimidazole derivatives: Influence of the N-1 substitution in protic and aprotic media / S. Bollo, P. Jara-Ulloa, G. Zapata-Torres [et al.] // Electrochimica acta. – 2010. – Vol. 55. – Is. 15. – P. 4558–4566.

56. Voltammetric behavior of a 4-nitroimidazole derivative: Nitro radical anion formation and stability / C. Yañez, J. Pezoa, M. Rodríguez [et al.] // Journal of the Electrochemical Society. – 2005. – Vol. 152. – Is. 6. – P. 46–51.

57. Tautomerism of 3-nitro-1, 2, 4-triazole-5-one radical anions / T. I. Vakulskaya, L. I. Larina, N. I. Protsuk [et al.] // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2009. – Vol. 47. – Is. 9. – P. 716–719.

58. ESR, electrochemical and ORAC studies of nitro compounds with potential antiprotozoal activity / M. C. Aravena, R. Figueroa, C. Olea Azar, V. J. Arán // Journal of the Chilean Chemical Society. – 2010. – Vol. 55. – Is. 2. – P. 244–249.

59. Ciminale, F. Radical anions of nitrobenzothiazoles: EPR study of conjugative properties of benzothiazolyl systems / F. Ciminale // Tetrahedron letters. – 2004. – Vol. 45. – Is. 30. – P. 5849–5852.

60. Ortho-Substituted (Aryl)(3-nitrobenzo [b] thiophen-2-yl) amines: Study of the Electrochemical Behavior / B. Cosimelli, C. Z. Lanza, E. Scavetta [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2009. – Vol. 113. – Is. 38. – P. 10260–10263.
61. Roffia, S. Electrochemical behaviour of 4-nitroimidazole and 2-methyl-5-nitroimidazole: Autoprotonation of anion radical and redox-catalysed reduction of the supporting electrolyte cation / S. Roffia, C. Gottardi, E. Vianello // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1982. – Vol. 142. – Is. 1–2. – P. 263–275.
62. Stradins, J. Intermediate products of electrochemical reduction of nitrofurans in aprotic media / J. Stradins, R. Gavars, L. Baumanė // *Electrochimica Acta*. – 1983. – Vol. 28. – Is. 4. – P. 495–500.
63. Evidence for a π Dimer in the Electrochemical Reduction of 1, 3, 5-Trinitrobenzene: A Reversible N₂-Fixation System / I. Gallardo, G. Guirado, J. Marquet, N. Vilà // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2007. – Vol. 46. – Is. 8. – P. 1321–1325.
64. Macías-Ruvalcaba, N. A. Studies of the electrochemical reduction of some dinitroaromatics / N. A. Macías-Ruvalcaba, J. P. Telo, D. H. Evans // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 600. – Is. 2. – P. 294–302.
65. Bartak, D. E. Stabilities of the anion radicals of nitrobenzyl derivatives / D. E. Bartak, M. D. Hawley // *Journal of the American Chemical Society*. – 1972. – Vol. 94. – Is. 2. – P. 640–642.
66. Klemm, L. Electrolytic generation of nucleophiles. III. Reductive acetylation of nitro and nitroso compounds. / L. Klemm, P. E. Iversen, H. Lund // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1974. – Vol. 28. – Is. 5. – P. 593–595.
67. Organic electrochemistry revised and expanded / Ed. O. Hammerich [et al.]. – CRC press : London, 2016. – P. 150–154.
68. Lund, H. On the electrochemistry of 2, 4, 6-triphenylnitrobenzene and related compounds / H. Lund // *Electrochimica acta*. – 2006. – Vol. 52. – Is. 1. – P. 272–277.

69. Tian, D. FT-IR spectroelectrochemical study of the reduction of 1, 4-dinitrobenzene on Au electrode: Hydrogen bonding and protonation in proton donor mixed media / D. Tian, B. Jin // *Electrochimica acta*. – 2011. – Vol. 56. – Is. 25. – P. 9144–9151.
70. Kinetics of protonation of the 1, 2-dinitrobenzene radical anion and dianion by phenol / M. A. Syroeshkin, A. S. Mendkovich, L. V. Mikhal'chenko [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2009. – Vol. 58. – P. 468–472.
71. Dimerization and protonation reactions of nitrosonitrobenzenes radical anions / L. V. Mikhalchenko, M. A. Syroeshkin, M. Y. Leonova [et al.] // *Russian Journal of Electrochemistry*. – 2011. – Vol. 47. – P. 1205–1210.
72. Evidence for a Transition Between Singlet and Triplet States in the Electrochemical Reduction of 2, 2'-4, 4'-Tetranitrobiphenyl / I. Gallardo, G. Guirado, J. Marquet [et al.] // *ChemPhysChem*. – 2001. – Vol. 2. – Is. 12. – P. 754–760.
73. Electron Acceptors of the Fluorene Series. 7.1 2, 7-Dicyano-4, 5-dinitro-9-X-fluorenes: Synthesis, Cyclic Voltammetry, Charge Transfer Complexation with N-Propylcarbazole in Solution, and X-ray Crystal Structures of Two Tetrathiafulvalene Complexes / I. F. Perepichka, L. G. Kuz'mina, D. F. Perepichka [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1998. – Vol. 63. – Is. 19. – P. 6484–6493.
74. Using room temperature ionic liquids as solvents to probe structural effects in electro-reduction processes. Electrochemical behavior of mutagenic disperse nitroazo dyes in room temperature ionic liquids / M. V. B. Zanoni, E. I. Rogers, C. Hardacre [et al.] // *International Journal of Electrochemical Science*. – 2009. – Vol. 4. – Is. 12. – P. 1607–1627.
75. Aryl Sulfones with Strongly Electron-Withdrawing Substituents Do Their Electrogenenerated Radical Anions Always Undergo a Single Cleavage Reaction? / J. F. Pilard, O. Fourets, J. Simonet [et al.] // *Journal of the Electrochemical Society*. – 2001. – Vol. 148. – Is. 4. – Article E171.
76. Farnia, G. Electrode reaction mechanism of nitroderivatives in aprotic solvents: Part 1. m-nitrophenol / G. Farnia, G. Mengoli, E. Vianello // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1974. – Vol. 50. – Is. 1. – P. 73–89.

77. Kinetics and mechanism of self-protonation reactions in organic electrochemical processes / C. Amatore, J. M. Savéant, G. Capobianco [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 1985. – Vol. 107. – Is. 7. – P. 1815–1824.
78. Brillas, E. Self-protonation effects in the electrochemical reduction mechanism of p-nitrobenzoic acid / E. Brillas, G. Farnia, M.G. Severin, [et al.] // *Electrochimica acta*. – 1986. – Vol. 31. – Is. 7. – P. 759-766.
79. Nitro radical anions from megalol and related nitroimidazoles in aprotic media. A father–son type reaction triggered by an acidic proton / M. Bontá, G. Chauviere, J. Périé [et al.] // *Electrochimica acta*. – 2002. – Vol. 47. – Is. 25. – P. 4045–4053.
80. Pérez-Jiménez, A. I. Reassessment of positional substituent effects: Influence in the chemistry of electrogenerated anion radicals from nitrobenzenesulfonamides during self-protonation pathways / A. I. Pérez-Jiménez, C. Frontana // *Electrochimica acta*. – 2012. – Vol. 82. – P. 463–469.
81. Electrochemical reduction of nitrobenzene and 4-nitrophenol in the room temperature ionic liquid [C4dmim][N (Tf) 2] / D. S. Silvester, A. J. Wain, L. Aldous [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2006. – Vol. 596. – Is. 2. – P. 131–140.
82. Voltammetric characterisation of the radical anions of 4-nitrophenol, 2-cyanophenol and 4-cyanophenol in N, N-dimethylformamide electrogenerated at gold electrodes / C. L. Forryan, N. S. Lawrence, N. V. Rees [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2004. – Vol. 561. – P. 53–65.
83. Jezuita, A. Substituent effects of nitro group in cyclic compounds / A. Jezuita, K. Ejsmont, H. Szatyłowicz // *Structural Chemistry*. – 2021. – Vol. 32. – Is. 1. – P. 179–203.
84. Kolarić, B. Molecular-orbital and structural descriptors in theoretical investigation of electroreduction of nitrodiazoles / B. Kolarić, I. Juranić, D. Dumanović // *Journal of the Serbian Chemical Society*. – 2005. – Vol. 70. – Is. 7. – P. 957–968.
85. Kuhn, A. Reduction potentials of para-substituted nitrobenzenes—an infrared, nuclear magnetic resonance, and density functional theory study / A. Kuhn, K. G. Von Eschwege, J. Conradie // *Journal of Physical Organic Chemistry*. – 2012. – Vol. 25. – Is. 1. – P. 58–68.

86. Beveridge, A. J. Calculation of one-electron reduction potentials for nitroheterocyclic hypoxia-selective agents / A. J. Beveridge, M. Williams, T. C. Jenkins // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. – 1996. – Vol. 92. – Is. 5. – P. 763–768.
87. Astalakshmi, N. Over View on Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure Based Drug Discovery / N. Astalakshmi, T. Gokul, K. B. Gowri Sankar // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. – 2022. – Vol. 77 – Is. 2. – P. 180–198.
88. A combined molecular docking/dynamics approach to probe the binding mode of cancer drugs with cytochrome P450 3A4 / S. Panneerselvam, D. Yesudhas, P. Durai [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – Is. 8. – P. 14915–14935.
89. Homology modeling, binding site identification, molecular docking and molecular dynamics simulation study of emerging and promising drug target of Wnt signaling–Human Porcupine enzyme / V. Goswami, D. Patel, S. Rohit [et al.] // *Results in Chemistry*. – 2024. – Article 101482.
90. Structural activity, spectroscopic, Fukui, NCI, AIM, IGM combined with molecular docking and molecular dynamics simulation on 4-methylpyridinium 4-hydroxybenzoate-potent drug anti-leukemia cancer / P. Divya, V. S. Jeba Reeda, R. Suja [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2024. – Vol. 306. – Article 123568.
91. Methimazole and propylthiouracil design as a drug for anti-graves' disease: Structural studies, Hirshfeld surface analysis, DFT calculations, molecular docking, molecular dynamics simulations, and design as a drug for anti-graves' disease / E. I. Edache, A. Uzairu, P. A. Mamza [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – Vol. 1289. – Article 135913.
92. A novel pyrazole derivative as COVID-19 main protease inhibitor: Synthesis, quantum computational studies, pharmacokinetic properties, drug likeness, molecular docking and dynamics simulation; a CADD approach / D. Rekharani, N. Shivalingegowda, Mahesha [et al.] // *Chemical Physics Impact*. – 2024. – Vol. 8. – Article 100475.

93. Design of novel small molecules derived from styrylpyridine as potent HDAC1 inhibitors for the treatment of gastric cancer using 3D-QSAR, drug similarity, ADMET prediction, molecular docking, and molecular dynamics studies / R. Haloui, K. ElKhatabi, K. Mkhayar [et al.] // *Scientific African*. – 2024. – Vol. 23. – Article e01990.
94. Assessing an ensemble docking-based virtual screening strategy for kinase targets by considering protein flexibility / S. Tian, H. Sun, P. Pan [et al.] // *Journal of chemical information and modeling*. – 2014. – Vol. 54. – Is. 10. – P. 2664–2679.
95. Ivetac, A. Molecular recognition in the case of flexible targets / A. Ivetac, J. Andrew McCammon // *Current pharmaceutical design*. – 2011. – Vol. 17. – Is. 17. – P. 1663–1671.
96. Incorporation of protein flexibility and conformational energy penalties in docking screens to improve ligand discovery / M. Fischer, R. G. Coleman, J. S. Fraser [et al.] // *Nature chemistry*. – 2014. – Vol. 6. – Is. 7. – P. 575–583.
97. Abagyan, R. High-throughput docking for lead generation / R. Abagyan, M. Totrov // *Current opinion in chemical biology*. – 2001. – Vol. 5. – Is. 4. – P. 375–382.
98. Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery / M. De Vivo, M. Masetti, G. Bottegoni [et al.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2016. – Vol. 59. – Is. 9. – P. 4035–4061.
99. Comparison of the binding energies of approved mpox drugs and phytochemicals through molecular docking, molecular dynamics simulation, and ADMET studies: An *in silico* approach / R. K. Mohapatra, A. Mahal, A. Ansari [et al.] // *Journal of Biosafety and Biosecurity*. – 2023. – Vol. 5. – Is. 3. – P. 118–132.
100. *In vitro* anti-inflammatory, *in silico* molecular docking and molecular dynamics simulation of oleanane-type triterpenes from aerial parts of *Mussaenda recurvata* / M. D. Tri, N. T. Phat, P. N. Minh [et al.] // *RSC advances*. – 2023. – Vol. 13. – Is. 8. – P. 5324–5336.
101. Lu, H. Drug–target residence time: critical information for lead optimization / H. Lu, P. J. Tonge // *Current opinion in chemical biology*. – 2010. – Vol. 14. – Is. 4. – P. 467–474.

102. Borhani, D. W. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery / D. W. Borhani, D. E. Shaw // *Journal of computer-aided molecular design*. – 2012. – Vol. 26. – P. 15–26.
103. Saikia, S. Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective / S. Saikia, M. Bordoloi // *Current drug targets*. – 2019. – Vol. 20. – Is. 5. – P. 501–521.
104. Elokely, K. M. Docking challenge: protein sampling and molecular docking performance / K. M. Elokely, R. J. Doerksen // *Journal of chemical information and modeling*. – 2013. – Vol. 53. – Is 8. – P. 1934–1945.
105. Che, X. An accurate and universal protein-small molecule batch docking solution using Autodock Vina / X. Che, Q. Liu, L. Zhang // *Results in Engineering*. – 2023. – Vol. 19. – Article 101335.
106. Bonfilio, R. Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review / R. Bonfilio, M. B. de Araújo, H. R. N. Salgado // *WSEAS transactions on biology and biomedicine*. – 2010. – Vol. 7. – Is. 4. – P. 316–338.
107. Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine / I. Campestrini, O. C. de Braga, I. C. Vieira [et al.] // *Electrochimica Acta*. – 2010. – Vol. 55. – Is. 17. – P. 4970–4975.
108. Ultra-sensitive voltammetric sensor for trace analysis of carbamazepine / A. Veiga, A. Dordio, A. J. P. Carvalho [et al.] // *Analytica chimica acta*. – 2010. – Vol. 674. – Is. 2. – P. 182–189.
109. Babaei, A. A glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotube/chitosan composite as a new sensor for simultaneous determination of acetaminophen and mefenamic acid in pharmaceutical preparations and biological samples / A. Babaei, M. Afrasiabi, M. Babazadeh // *Electroanalysis*. – 2010. – Vol. 22. – Is. 15. – P. 1743–1749.
110. Square wave voltammetric determination of nitrofurantoin in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes at different boron-doping contents / P. de Lima-Neto, A. N. Correia, R. R. Portela [et al.] // *Talanta*. – 2010. – Vol. 80. – Is. 5. – P. 1730–1736.

111. Voltammetric determination of cefixime in pharmaceuticals and biological fluids / R. Jain, V. K. Gupta, N. Jadon [et al.] // *Analytical biochemistry*. – 2010. – Vol. 407. – Is. 1. – P. 79–88.
112. Voltammetric behavior and determination of trace amounts of omeprazole using an edge-plane pyrolytic graphite electrode / S. Shahrokhian, M. Ghalkhani, M. Bayat [et al.] // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. – 2015. – Vol. 14. – Is. 2. – P. 465–471.
113. VEDIAPPAN, K. Electrochemical approaches for the determination of ranitidine drug reaction mechanism / K. VEDIAPPAN, C. W. LEE // *Current applied physics*. – 2011. – Vol. 11. – Is. 4. – P. 995–1000.
114. Lal, G. Electrochemical behavior and validated determination of the azathioprine in bulk form and body fluids / G. Lal, P. Sinha // *Der Pharmacia Sinica*. – 2013. – Vol. 4. – Is. 3. – P. 80–94.
115. Kor, K. β -Cyclodextrin Incorporated Carbon Nanotube Paste Electrode as Electrochemical Sensor for Nifedipine / K. Kor, K. Zarei // *Electroanalysis*. – 2013. – Vol. 25. – Is. 6. – P. 1497–1504.
116. Ghavami, R. Determination of nimesulide in human serum using a glassy carbon electrode modified with SiC nanoparticles / R. Ghavami, A. Navaee // *Microchimica Acta*. – 2012. – Vol. 176. – P. 493–499.
117. Jain, R. Effect of surfactant on voltammetric behaviour of ornidazole / R. Jain, R. Mishra, A. Dwivedi // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2009. – Vol. 337. – Is. 1-3. – P. 74–79.
118. Validated voltammetric method for the determination of some antiprotozoa drugs based on the reduction at an activated glassy carbon electrode / H. M. Elqudaby, G. G. Mohamed, F. A. Ali [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2013. – Vol. 6. – Is. 3. – P. 327–333.
119. El-Desoky, H. S. Stripping voltammetric methods for determination of the antiparasitic drug nitazoxanide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum / H. S. El-Desoky, M. M. Ghoneim, M. M. Abdel-Galeil // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2010. – Vol. 21. – P. 669–679.

120. Radi, A. E. Anodic voltammetric methods for determination of the antiparasitic drug nitazoxanide in bulk form, pharmaceutical formulation, and its metabolite tizoxanide in human serum / A. E. Radi, N. A. El-Ghany, T. Wahdan // *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. – 2012. – Vol. 143. – P. 697–702.

121. Gandhi, S. Simultaneous voltammetric determination of nitazoxanide and ofloxacin in pharmaceutical formulation / S. Gandhi, V. Mehta, S. Rajput // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Vol. 73. – Is. 5. – P. 583–586.

122. Jain, R. Voltammetric behaviour of nitrazepam in solubilized systems. / R. Jain, R. Mishra, A. Dwivedi // *Journal of Scientific and Industrial Research*. – 2009. – Vol. 68. – P. 540–547.

123. Jain, R. Square-wave adsorptive stripping voltammetric behaviour of entacapone at HMDE and its determination in the presence of surfactants / R. Jain, R. K. Yadav, A. Dwivedi // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2010. – Vol. 359. – Is. 1–3. – P. 25–30.

124. Peng, J. Determination of metronidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at graphene and ionic liquid composite film modified electrode / J. Peng, C. Hou, X. Hu // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2012. – Vol. 169. – P. 81–87.

125. Fotouhi, L. Electrochemistry and voltammetric determination of furazolidone with a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode / L. Fotouhi, M. Nemati, M. M. Heravi // *Journal of Applied Electrochemistry*. – 2011. – Vol. 41. – P. 137–142.

126. Ghoneim, M. M. Electrochemistry of the antibacterial and antifungal drug nitroxoline and its determination in bulk form, pharmaceutical formulation and human blood / M. M. Ghoneim, H. S. El-Desoky, M. M. Abdel-Galeil // *Bioelectrochemistry*. – 2011. – Vol. 80. – Is. 2. – P. 162–168.

127. Voltammetric determination of anticancer drug flutamide in surfactant media at polymer film modified carbon paste electrode / P. K. Brahma, R. A. Dar, S. Tiwari [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2012. – Vol. 396. – P. 8–15.

128. Jain, R. Voltammetric assay of anti-anginal drug nicorandil in different solvents / R. Jain, R. K. Yadav // *Drug Testing and Analysis*. – 2011. – Vol. 3. – Is. 3. – P. 171–175.
129. Lab-on-a-screen-printed electrochemical cell for drop-volume voltammetric screening of flunitrazepam in untreated, undiluted alcoholic and soft drinks / F. Tseliou, P. Pappas, K. Spyrou [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2019. – Vol. 132. – P. 136–142.
130. A noble electrochemical sensor based on TiO₂@ CuO-N-rGO and poly (L-cysteine) nanocomposite applicable for trace analysis of flunitrazepam / E. Sohoulı, M. Ghalkhani, M. Rostami [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – Vol. 117. – Article 111300.
131. Application of MnFe₂O₄ and AuNPs modified CPE as a sensitive flunitrazepam electrochemical sensor / B. M. Asiabar, M. A. Karimi, H. Tavallali [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2021. – Vol. 161. – Article 105745.
132. A simply fabricated electrochemically pretreated glassy carbon electrode for highly sensitive determination of clonazepam by adsorptive cathodic stripping voltammetry / S. Khoka, K. Samoson, J. Yodrak [et al.] // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2021. – Vol. 168. – Is. 5. – Article 057513.
133. Alghamdi, A. F. Novel acyclonucleoside analog bearing a 1, 2, 4-triazole–Schiff base: Synthesis, characterization and analytical studies using square wave-adsorptive stripping voltammetry and HPLC / A. F. Alghamdi, N. Rezki // *Journal of Taibah University for Science*. – 2017. – Vol. 11. – Is. 5. – P. 759–767.
134. Shishkanova, T. V. Voltammetric Detection of Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid Using Urea-Derivative-Modified Graphite Electrode / T. V. Shishkanova, F. Králík, A. Synytsya // *Sensors*. – 2023. – Vol. 23. – Is. 7. – Article 3727.
135. Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical reduction on a glassy carbon electrode / O. C. Braga, I. Campestrini, I. C. Vieira [et al.] // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2010. – Vol. 21. – P. 813–820.

136. Electrooxidation of sulfanilamide and its voltammetric determination in pharmaceutical formulation, human urine and serum on glassy carbon electrode / B. R. L. Ferraz, T. Guimarães, D. Profeti [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2018. – Vol. 8. – Is. 1. – P. 55–59.

137. Nikodimos, Y. Electrochemical determination of metronidazole in tablet samples using carbon paste electrode // *Journal of analytical methods in chemistry*. – 2016. – Article 3612943.

138. Taye, A. Voltammetric determination of tinidazole in pharmaceutical tablets using carbon paste electrode / A. Taye, M. Amare // *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. – 2016. – Vol. 30. – Is. 1. – P. 1–12.

139. El-Sayed, G. O. Determination of secnidazole in tablets and human serum by cathodic adsorptive stripping voltammetry / G. O. El-Sayed, S. A. Yasin, A. A. El Badawy // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2010. – Vol. 3. – Is. 3. – P. 167–172.

140. Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-printed Carbon Electrodes for the Triazid as Potential Antiviral Drug / A. Ivoilova, N. Malakhova, P. Mozharovskaia [et al.] // *Electroanalysis*. – 2022. – Vol. 34. – Is. 11. – P. 1745–1755.

141. Development and Validation of Voltammetric Method for Quantitation of New Antiviral Drug Triazavirin using Bare Carbon Screen-Printed Electrodes / N. Malakhova, A. Tsmokalyuk, A. Ivoilova, [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*. – 2019. – Vol. 11. – Is. 3. – P. 292–303.

142. Rusinov, V. L. Biologically active azolo-1, 2, 4-triazines and azolopyrimidines / V. L. Rusinov, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin // *Russian Chemical Bulletin*. – 2018. – Vol. 67. – Is. 4. – P. 573–599

143. Патент № 2402552 Российская Федерация, МПК C07D 487/04. Натриевая соль 2-н-пропилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она дигидрат и натриевая соль 2-н-бутилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она дигидрат : заявл. 23.12.2008 : опубл. 27.10.2010 / Чупахин О. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Чарушин В. Н., Медведева Н. Р., Киселев О. И., Деева Э. Г., Синяшин О. Г., Мамедов В. А. ; патентообладатель Институт

органической и физической химии им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН. – 2 с.

144. Противовирусный препарат «Триазавирин»: от скрининга до клинической апробации / Э. Г. Деева, В. Л. Русинов, В. Н. Чарушин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 2, №. 7. – С. 144–151.

145. Патент № 2404182 Российская Федерация, МПК C07D 487/04. Натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она дигидрат : заявл. 14.107.2008 : опубл. 21.01.2010 / Чупахин О. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Чарушин В. Н., Медведева Н. Р., Киселев О. И., Деева Э. Г., Логинова С. Я., Борисевич С. В., Бондарев В. П. ; патентообладатель ИОС УрО РАН. – 5 с.

146. Дрокин, Р. А. 4-гидрокси-1, 4-дигидроазоло [5, 1-с][1, 2, 4] триазины: синтез и биологическая активность : дис. кандидата химических наук / Дрокин Роман Александрович. – Екатеринбург, 2022. – 145 с.

147. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. М. : Книга по Требованию. – 2012. – 440 с.

148. Perrin, D. D. Purification of laboratory chemicals / D. D. Perrin, W. L. F Armarego. – Boston : Butterworth-Heinemann. – 1966. – 544 p.

149. Dikalov, S. Spin trapping of superoxide radicals and peroxyxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants / S. Dikalov, M. Skatchkov, E. Bassenge // Biochemical and biophysical research communications. – 1997. – V. 231. – Is. 3. – P. 701–704.

150. Dikalov, S. I. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines / S. I. Dikalov, I. A. Kirilyuk, M. Voinov [et al.] // Free radical research. – 2011. – V. 45. – Is. 4. – P. 417–430.

151. Bono, D. The effect of myoglobin on the stability of the hydroxyl-radical adducts of 5, 5 dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), 3, 3, 5, 5 tetramethyl-1- pyrroline-N-oxide (TMPO) and 1-alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) in the presence of

hydrogen peroxide / D. Bono, W. D. Yang, M. C. R. Symons // Free radical research. – 1994. – V. 20. – Is. 5. – P. 327–332.

152. Neese, F. The ORCA quantum chemistry program package / F. Neese, F. Wennmohs, U. Becker [et al.] // The Journal of chemical physics. – 2020. – Vol. 152. – Article 224108.

153. Neese, F. The ORCA program system / F. Neese // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2012. – Vol. 2. – Is. 1. – P. 73–78.

154. Stoll, S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR / S. Stoll, A. Schweiger // Journal of magnetic resonance. – 2006. – Vol. 178. – Is. 1. – P. 42–55.

155. The electrochemical behavior's character of a potential antiviral drug 3-nitro-4-hydroxy-7-methylthio-4H-[1, 2, 4] triazolo [5, 1-c][1, 2, 4] triazinide monohydrate / P. N. Mozharovskaia, A. V. Ivoilova, R. A. Drokin [et al.] // Chimica Techno Acta. – 2022. – Vol 9. – Is. 4. – Article 20229426.

156. Lund, H. Organic Electrochemistry : An Introduction and a Guide / H. Lund, Ed. M. Baizer. – New York : Marcel Dekker, 1983. – 1393 p.

157. Electroanalytical Methods / F. Scholz, A. M. Bond, R. G. Compton [et al.]. – Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. – 359 p.

158. An electrochemical sensor based on carbon paper modified with graphite powder for sensitive determination of sunset yellow and tartrazine in drinks / N. Y. Stozhko, E. I. Khamzina, M. A. Bukharinova [et al.] // Sensors. – 2022. – Vol. 22. – Is. 11. – Article 4092.

159. Dorraji, P. S. Electrochemical fabrication of a novel ZnO/cysteic acid nanocomposite modified electrode and its application to simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine / P. S. Dorraji, F. Jalali // Food chemistry. – 2017. – Vol. 227. – P 73–77.

160. Qiu, X. An enhanced electrochemical platform based on graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes nanocomposite for sensitive determination of Sunset Yellow and Tartrazine / X. Qiu, L. Lu, J. Leng [et al.] // Food chemistry. – 2016. – Vol. 190. – P. 889–895.

161. Будников, Г. К. Основы современного электрохимического анализа / Г. К. Будников, В. Н. Майстренко, М. Р. Вяселев. – Москва : Мир: Бином ЛЗ. – 2003. – 592 с.
162. Горбачев, С. В. Температурно-кинетический метод и его применение / С. В. Горбачев, В. И. Никич // Тр. Моск. хим.-технол. ин-та. – 1974. – Т. 101. – С. 101–110.
163. Горбачев, С. В. Влияние температуры на электролиз как кинетический метод исследования природы электрохимических процессов / С. В. Горбачев // Сборник научных трудов. – Москва : АН СССР. – 1959. – С. 61–71.
164. Rastogi, P. K. Palladium nanoparticles incorporated polymer-silica nanocomposite based electrochemical sensing platform for nitrobenzene detection / P. K. Rastogi, V. Ganesan, S. Krishnamoorthi // *Electrochimica Acta*. – 2014. – Vol. 147. – P. 442–450.
165. Huang, Y. Electrochemical behaviour of nitrobenzene, nitrosobenzene, azobenzene, and azoxybenzene on Hg, Pt, Cu, and Ni electrodes in aprotic medium / Y. Huang, J. Lessard // *Electroanalysis*. – 2016. – Vol. 28. – Is. 11. – P. 2716–2727.
166. Triazavirin—A novel effective antiviral drug / O. N. Chupakhin, V. L. Rusinov, M. V. Varaksin [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Is. 23. – Article 14537.
167. Mozharovskaia, P. N. Voltammetric Determination of a Potential Antiviral Drug Sodium Salt of 3-Nitro-4-Hydroxy-7-Methylthio-4H-[1,2,4]Triazolo[5,1-c][1,2,4]Triazinide Monohydrate / P. N. Mozharovskaia, A. V. Ivoilova, N. A. Malakhova // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2024. – Vol. 79. – Is. 6. – P. 733–739.
168. Патент № 2733397 Российская Федерация, МПК G01N 33/15. Способ количественного определения триазида методом вольтамперометрии : заявл. 21.02.2019 : опубл. 01.10.2020 / Малахова Н. А., Ивойлова А. В., Цмокалюк А. Н., Козицина А. Н., Иванова А. В., Русинов В. Л. ; патентообладатель ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина. – 2 с.

169. 4-Гидрокси-3-нитро-1,4-дигидротриазоло[5,1-с][1,2,4]триазины: синтез, противовирусные свойства и электрохимические характеристики / Р. А. Дрокин, Е. А. Фесенко, П. Н. Можаровская [и др.] // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2022. – Т. 71, № 11. – С. 2460–2466.
170. Egorova, L. G. NH acidities of 7-oxo-4, 7-dihydropyrazolo-and 1, 2, 4-triazolo [5, 1-c][1, 2, 4] triazines / L. G. Egorova, A. Y. Petrov, V. L. Rusinov // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 1984. – Vol. 20. – P. 564–566.
171. Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютини́на вирусов гриппа / Д. Н. Щербинин, С. В. Алексеева, М. М. Шмаров [и др.] // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2016. – Т. 8, №. 1 (28). – С. 14–22.
172. Вольтамперометрическое определение натриевой соли 7-этилтио-3-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-4-она дигидрата как потенциального противовирусного лекарственного средства / П. Н. Можаровская, А. В. Ивойлова, Т. В. Демьянович Селянина [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78, № 12. – С. 1144–1150.

Приложение А (обязательное)

Справка о внедрении



620028, г. Екатеринбург, ул. Кирова 28 пом. 205 E-mail: info@triazavir.ru Тел (343) 270-75-71

25.06.2024 № 35/18

На № _____ от _____

СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ

Настоящим подтверждаем, что результаты диссертационного исследования Можаровской Полины Николаевны по научной специальности 1.4.2. – «Аналитическая химия», выполненные на кафедре аналитической химии, химико-технологического института, Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина по разработке методик количественного вольтамперометрического определения соединений-кандидатов в качестве действующего вещества лекарственных средств – «Натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрат в стандартном образце на стеклоуглеродном электроде» и «Натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата в стандартном образце на толстопленочном углеродсодержащем электроде» представляют практический интерес, были опробованы, признаны пригодными в компании ООО «Завод Медсинтез» и будут внедрены в технологический процесс в случае промышленного производства потенциальных лекарственных противовирусных препаратов.

Разработанные методики являются экспрессными, чувствительные, выполняются с использованием недорогого и портативного инструментария, что делает их альтернативой широко используемому методу ВЭЖХ. Диапазон линейности для определения натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида моногидрата на стеклоуглеродном электроде с химическим удалением кислорода в нейтральной среде составляет 10 – 300 мг/дм³, предел обнаружения – 1,7 мг/дм³, предел количественного определения – 5,2 мг/дм³. Методика количественного определения натриевой соли 3-нитро-4-оксо-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида дигидрата на толстопленочном углеродсодержащем электроде в нейтральной среде с химическим удалением кислорода позволяет определять соединение в диапазоне концентрации от 10 до 500 мг/дм³, предел обнаружения – 1,2 мг/дм³, предел количественного определения – 3,6 мг/дм³.

Генеральный директор

А.Б. Подкорытов

Маркова О.А.
+7 (343) 204 79 94 вн.385

