

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.063

doi: 10.26907/2542-064X.2024.3.387-400

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ХЛОРНИТРОЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗОФУРОКСАНОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

С.Ю. Гармонов¹, И.А. Салахов², Л.М. Юсупова¹

*¹Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, 420015, Россия*

²ООО «Нанофарма девелопмент», г. Казань, 420095, Россия

Аннотация

Хлорнитропроизводные бензофураксана являются соединениями, проявляющими выраженную биологическую (антибактериальную, фунгицидную, NO-донорную) и другие виды активности и обладающими при этом низкой токсичностью. Для дальнейшей их фармацевтической разработки и создания лекарственных форм на их основе необходимы методы контроля качества, обеспечивающие избирательное и чувствительное определение действующих веществ. Для 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксана (4,6-ДН-5,7-ДХБФО), 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксана (5-Н-4,6-ДХБФО), а также технологических примесей их синтеза разработан способ одновременного определения аналитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодно-матричным детектированием. Изучено их хроматографическое поведение при использовании различных обращенных фаз. Показано, что хорошее разделение компонентов достигается на амидной и нитрильной фазах. Установлены оптимальные условия хроматографического разделения при использовании колонки Discovery RP Amide C16 4.6×250 мм и изократическом элюировании смесью 0.05%-ная H_3PO_4 – ацетонитрил – метанол (51:34:15, об. %) при длинах волн детектирования 245 и 207 нм. Линейность градуировочных зависимостей достигается в интервале 0.5–200 мкг/мл с пределами детектирования до 0.12 мкг/мл. Разработанная методика использована для количественного определения хлорнитропроизводных бензофураксана в их смесях и лекарственных формах на их основе.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксан, 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксан, родственные и технологические примеси, контроль качества, лекарственные формы.

Введение

Весьма привлекательным с точки зрения медицинской и фармацевтической химии является получение замещенных бензофураксанов [1–7]. Такие хлорнитропроизводные бензофураксана, как 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксан (4,6-ДН-5,7-ДХБФО) и 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксан (5-Н-4,6-ДХБФО), достаточно хорошо изучены в качестве ветеринарных антибактериальных, про-

тивогрибковых и акарицидных средств [5–9]. При этом эти биологически активные соединения легко подвергаются функционализации [5, 10–12]. Они эффективно подавляют ультрарезистентные виды супербактерий *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, патогенных грибов *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp. и другие микроорганизмы. Описаны противоопухолевые свойства [13, 14] и NO-донорная активность фуроксанов [15, 16]. Все это обуславливает дальнейшую разработку на их основе лекарственных средств и препаратов биологической защиты различных материалов, а также использование в агрохимической практике.

Уникальность 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО как биологически активных веществ состоит в сочетании их выраженной антибактериальной, фунгицидной, противовирусной, акарицидной, вирулицидной, спороцидной и лярвицидной активности с достаточно низкой токсичностью (LD_{50} 3500 мг/кг). Необходимо отметить, что при их смешении наблюдается значительное усиление антибактериального и фунгицидного действия, что обеспечивает синергизм фармакологического эффекта при гораздо более низких содержаниях действующих веществ [8].

В литературе представлены методы синтеза 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО и многочисленных новых функциональных производных на их основе, позволяющих получать все эти соединения с достаточно высокими выходами [5–7]. Однако изучение оптимальных условий их получения с точки зрения дальнейшей фармацевтической разработки предусматривает применение концепции Quality by Design (QbD), при этом использование избирательных, чувствительных и производительных способов определения действующих веществ является важной ее частью, позволяющей понять, как параметры процесса получения могут оказывать влияние на характеристики готового продукта [17]. Дальнейшая фармацевтическая разработка 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО и их замещенных производных с целью создания фармацевтических субстанций и оптимизации технологических процессов получения их лекарственных форм должна включать стандартизацию методов контроля качества этих соединений. Особую значимость в этом случае приобретает обеспечение безопасности и эффективности получаемых лекарственных препаратов. При этом одним из принципов QbD является создание и внедрение стратегии контроля качества и критических точек процесса синтеза действующих веществ [18].

Ранее описано спектрофотометрическое определение 4,6-ДН-5,7-ДХБФО в смеси с 5-Н-4,6-ДХБФО, которое основано на его избирательном поглощении в длинноволновой области спектра, а также их определение методом тонкослойной хроматографии [19]. Однако важным при осуществлении контроля качества является одновременное определение каждого из них, а также родственных и технологических примесей в субстанциях. Такими возможностями в полной мере обладает высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), особенно со спектрофотометрическим вариантом детектирования, для которой значительный объем получаемой аналитической информации способствует все более широкому внедрению в практику как постадийного производственного контроля, так и анализа готовых продуктов.

Целью настоящей работы явилась оценка возможностей хроматографического разделения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО, их родственных и техно-

логических примесей в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ, а также разработка на этой основе методики определения компонентов биологически активных смесей и лекарственных форм на их основе.

1. Экспериментальная часть

1.1. Объекты исследования. В качестве объектов хроматографического исследования использованы субстанции 5-Н-4,6-ДХБФО и 4,6-ДН-5,7-ДХБФО; их физические смеси при соотношении 5-Н-4,6-ДХБФО к 4,6-ДН-5,7-ДХБФО 20:80, 80:20 и 70:30 (масс. %) соответственно, полученные по известным методам [20]. Структурные формулы аналитов приведены на рис. 1.

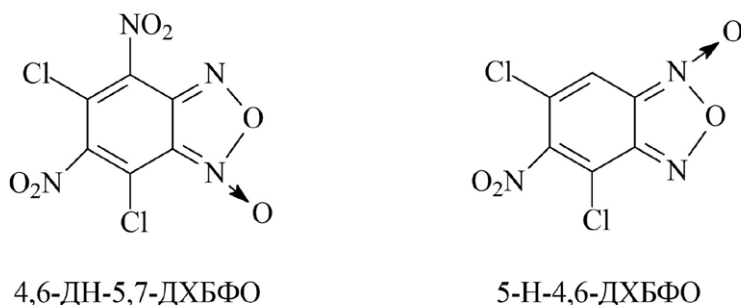


Рис. 1. Структурные формулы рассматриваемых хлорнитропроизводных бензофуроксана

1.2. Приборы и оборудование. В работе использовали жидкостные хроматографы фирмы Schimadzu (Япония): LC-20, состоящий из двухканального насоса для создания градиента высокого давления (LC-20AB), термостата колонок (СТО-20А), инжектора «Реодайн», вакуум-дегазатора, последовательно соединенных диодно-матричного (SPD-M 20А) и флуоресцентного (RF-10АХI) детекторов, и LC-20, состоящий из четырехканального насоса для создания градиента низкого давления (LC-20АТ), термостата колонок (СТО-10А), инжектора «Реодайн», вакуум-дегазатора, диодно-матричного (SPD-M 20А) детектора.

В предварительных испытаниях для определения спектров анализируемых веществ использовали УФ-спектрометр марки SPECORD 40 фирмы Analytik Jena (Германия), сканирующий в диапазоне от 190–1100 нм.

Для контроля кислотности использовали рН-метр рН 211 фирмы Hanna (Румыния). Подготовку проб проводили с использованием центрифуги minispin Plus, Eppendorf (Германия) и ультразвуковой ванны УЗВ1-0,16/18 фирмы УЗТ (Россия). Взятие навесок осуществляли при помощи аналитических весов GH252, HR-200 фирмы AND (Япония). Для получения сверхчистой воды бидистиллированную воду дополнительно очищали на установке Simplicity Millipor (Франция).

Для приготовления элюентов и пробоподготовки использовали ацетонитрил (HPLC-grade) и метанол (HPLC) (Panreac, Испания), трифторуксусную (Sigma, США) и фосфорную (Sigma, США) кислоты.

1.3. Методика определения. Для лекарственных форм на основе субстанций 5-Н-4,6-ДХБФО и 4,6-ДН-5,7-ДХБФО брали навеску около 0.3 г (с точностью ± 0.0002 г), растворяли в 10 см³ ацетонитрила, количественно переносили в мерную колбу на 25 см³ и доводили до метки этим же растворителем. Далее

раствор перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр PTFE с диаметром пор не более 0.45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. 2.5 см³ раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводили объем раствора смесью 0.05%-ная H₃PO₄ – ацетонитрил – метанол (51:34:15, об. %) до метки и перемешивали. Хроматографировали раствор, получая не менее пяти хроматограмм. Используя градуировочную зависимость, которая была построена в тех же условиях, определяли количественное содержание 5-Н-4,6-ДХБФО и 4,6-ДН-5,7-ДХБФО в образце.

При проведении анализа хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы раствора стандартного образца аналита выполняются следующие условия: эффективность хроматографической колонки не менее 2000 теоретических тарелок; фактор асимметрии пика не более 2; относительное стандартное отклонение площадей пиков не более 2 %.

1.4. Статистическая обработки данных. Для каждого определения проводили от четырех до десяти параллельных измерений. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета Excel (Microsoft Corp., США). Результаты представляли как среднее значение величины и доверительный интервал. Погрешность определения оценивали через величину относительного стандартного отклонения (s_r).

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Изучение условий хроматографического разделения. При выборе условий для эффективного разделения хлорнитропроизводных бензофураксана в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ учитывали природу используемых неподвижной и подвижной фаз, их рН, аналитические длины волн детектирования разделяемых соединений. В щелочной среде 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО являются неустойчивыми соединениями, хотя при более низких значениях рН они достаточно стабильны [1, 15]. Это послужило основой для выбора в качестве подвижных фаз растворителей со слабой элюирующей силой, в частности, водных растворов трифторуксусной и ортофосфорной кислот, подавляющих степень диссоциации остаточных силанольных групп силикагеля основы сорбента. В этом случае наблюдается улучшение формы пика и эффективность разделения аналитов. В качестве сильного элюента для разделения смесей 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО использованы ацетонитрил и водные смеси на его основе. В то же время необходимо отметить, что все производные хлорнитробензофураксана и промежуточные продукты их синтеза достаточно легко растворимы и стабильны к гидролитическим процессам в ацетонитриле. По этой причине смеси ацетонитрил – вода, ацетонитрил – 0.5%-ная H₃PO₄ применялись также и для подготовки проб анализируемых веществ.

Выбор аналитических длин волн детектирования разделяемых соединений производили на основании их электронных спектров поглощения, полученных с помощью диодно-матричного детектора непосредственно при условиях разделения в потоке хроматографической системы. На рис. 2 представлены спектры поглощения хлорнитропроизводных бензофураксана и промежуточных продуктов их синтеза в используемой подвижной фазе. Как видно,

для 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО в качестве аналитической длины волны можно использовать максимум поглощения при 390 нм. Возможные примеси 1-нитро-2,4,6-трихлорбензола и 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидобензола можно детектировать при 245 нм на плече спектра поглощения в случае их высокого содержания в смеси, а при более низких содержаниях можно использовать длину волны 207 нм, при которой светопоглощение данных соединений значительно выше, чем при 245 нм.

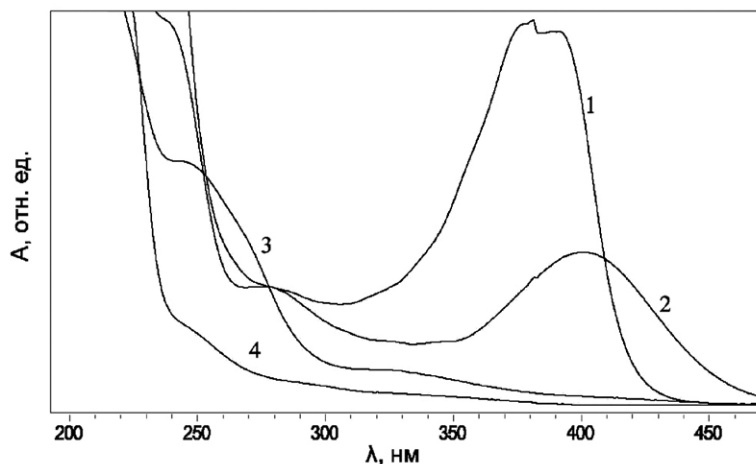


Рис. 2. Спектры поглощения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО (1), 5-Н-4,6-ДХБФО (2), 1,3-динитро-2,4,6-трихлорбензола (3) и 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидобензола (4) по данным диодно-матричного детектора в подвижной фазе состава: 0.5%-ная H_3PO_4 – ацетонитрил (70:30, об. %)

Для оценки хроматографического поведения аналитов вначале использовали распространенные сорбенты C18, традиционно применяемые в практике ВЭЖХ анализа. При этом 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО продемонстрировали достаточно высокую гидрофобность. Так, для их элюирования из колонки со временем удерживания до 30 мин требовалось содержание 30–40 (об. %) ацетонитрила в подвижной фазе. Изменение селективности разделения данной пары на неполярных сорбентах осложняется тем, что оба соединения имеют сходную структуру и наличие дополнительной нитрогруппы у 4,6-ДН-5,7-ДХБФО незначительно влияет на эффективность их разделения. В связи с этим оба соединения элюируются одним пиком на сорбентах следующих хроматографических колонок: Luna 5 мкм, C8(2), 100Å; Pecoshere 5 мкм, C18, 80Å; Nucleosil 5 мкм, C18-AB, 100Å; Discovery 5 мкм, C18-HS, 100Å; Symmetry 5 мкм, C18, 100Å. В то же время колонка XTerra 5 мкм, C18-RP, 125Å продемонстрировала более высокую способность к разделению пары 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО. Но при этом наблюдалась низкая степень разрешения между пиками (1.06) и селективность (1.02) при большом времени удерживания компонентов (около 25 мин). Необходимо отметить, что при изготовлении этого сорбента используется основа не из чистого силикагеля, как у значительного большинства колонок, а органически-неорганический гибридный материал [21, 22]. Именно в этом случае метилсилоксановые группы и силикагель равномерно распределены на поверхности сорбента, жесткость частиц материала в таком

случае сопоставима с сорбентами на основе чистого силикагеля, а полимерная составляющая обеспечивает устойчивость к широкому диапазону изменения рН подвижной фазы. Не менее важным является то, что при такой гибридной технологии значительно снижается число нежелательных свободных силанольных групп сорбента в сравнении с классическими фазами.

Для существенного изменения селективности разделения был выбран нитрильный сорбент марки Spheri Cyano 110 Å – 5 мкм, являющийся одним из наименее удерживающих материалов среди обращенно-фазовых. Как и ожидалось, этот сорбент характеризуется достаточно хорошей способностью к разделению 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО (рис. 3). Однако нитрильная фаза не часто используется в практике лабораторий по контролю качества продукции, где преимущественно применяются традиционные фазы C18.

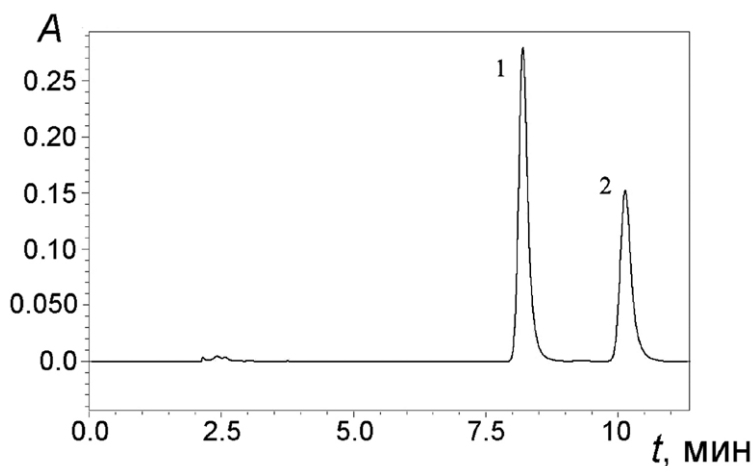


Рис. 3. Хроматограмма 100 мкг/мл 5-Н-4,6-ДХБФО (1) и 4,6-ДН-5,7-ДХБФО (2). Колонка: Spheri-5 CYANO 110 – 5, 4.6×220 мм. Элюент 0.05%-ная CF_3COOH – ацетонитрил (40:60, об. %). Детектирование при 390 нм. Температура колонки 25 °С

Известно, что модификация традиционных неподвижных гидрофобных фаз амидными группами позволяет существенно изменить селективность разделения [21, 23]. Особенностью таких сорбентов является присутствие полярных амидных групп у основания гидрофобных углеводородных радикалов с длиной цепи C16. При этом амидные группы эффективно выполняют роль электростатического барьера между свободными, незамещенными гидроксильными группами силикагеля, тем самым предотвращая электростатические взаимодействия молекул анализируемых веществ. Данные особенности сорбента позволяют также нивелировать взаимодействия соединений, имеющих основные и кислотные свойства с активными центрами поверхности силикагеля. Все это послужило причиной улучшения формы пика и селективности, отличной от общепринятых фаз C18. На фазе RP Amide C16 удалось провести хорошее разделение целевых аналитов и технологических, родственных примесей их синтеза при использовании изократического режима элюирования с приемлемым для количественных определений временем удерживания компонентов (рис. 4). При этом достигаемое разрешение между двумя соседними пиками хлорнитропроизводных бензофуроксана больше 1.5 при симметрии пика, близкой к единице.

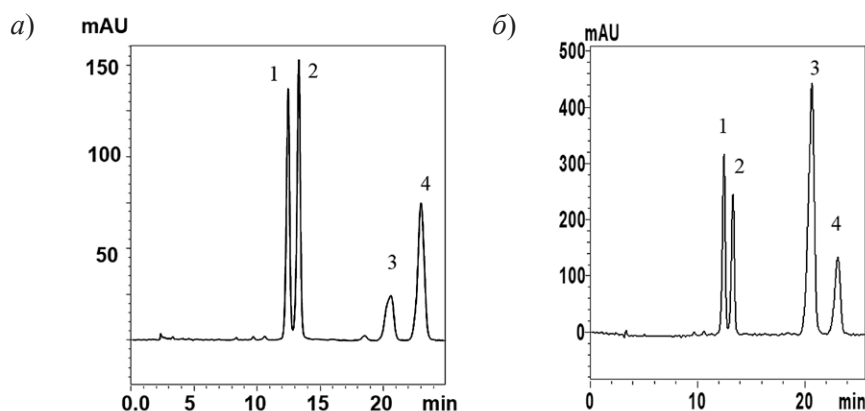


Рис. 4. Хроматограмма 5-Н-4,6-ДХБФО (1), 4,6-ДН-5,7-ДХБФО (2), 1,3-динитро-2,4,6-трихлорбензола (3), 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидобензола (4) при концентрации 40 мкг/мл. Колонка: Discovery RP Amide C16, 4,6×250 мм. Длина волны 245 нм (а), 207 нм (б). Элюент: 0.05%-ная H_3PO_4 – ацетонитрил – метанол (51:34:15, об. %). Температура колонки 50 °С

2.2. Хроматографическое определение 5-Н-4,6-ДХБФО, 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и их родственных примесей. Оценка пригодности хроматографической системы при использовании колонки RP Amide C16 представлена в табл. 1.

Табл. 1

Пригодность хроматографической системы при определении 5-Н-4,6-ДХБФО, 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и родственных примесей ($n = 10$, $\lambda = 245$ нм)

Соединение	$t_{\text{уд}}^*$ мин	A_s	N	R_s	α	k'	$S_r t_{\text{уд}}^*$ %	S_r площадь ди пика, %
5-Н-4,6-ДХБФО	12.48	1.08	10866	—	—	5.24	0.29	0.33
4,6-ДН-5,7-ДХБФО	13.31	1.11	10966	1.71	1.08	5.66	0.27	0.35
1,3-Динитро- 2,4,6-трихлорбензол	20.64	0.910	5148	8.83	1.65	9.32	0.34	0.45
3,5-Дихлор- 2,4,6-тринитро- 1-азидобензол	23.09	0.960	8696	2.28	1.13	10.5	0.37	0.42

Примечания: A_s – фактор симметрии хроматографических пиков, N – число теоретических тарелок, R_s – разрешение между пиками, α – коэффициент селективности, k' – фактор удерживания

Представленные данные по разрешающей способности хроматографической системы и разделению пиков, а также по эффективности, фактору асимметрии, относительному стандартному отклонению площадей пиков 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО и технологических примесей подтверждают ее пригодность для решения поставленных задач.

Для установления возможности хроматографического определения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО и технологических примесей в них методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием проведены эксперименты по оценке правильности определений, линейности и аналитической области методики, ее стабильности, сходимости результатов, влияния вспомогательных ве-

ществ лекарственных форм на правильность определений, а также характеристик чувствительности методики.

Основные аналитические характеристики разработанной методики представлены в табл. 2. Линейность и воспроизводимость градуировочных зависимостей площадей пиков от концентрации аналитов достигается в широком интервале 0.5–200 мкг/мл с достижением пределов детектирования до 0.12 мкг/мл при высоких значениях коэффициентов корреляции. Значения относительного стандартного отклонения ($n = 6$) в условиях повторяемости для 1.0 и 50 мкг/мл не превышали 5 и 2 % соответственно.

Табл. 2

Аналитические характеристики методики ВЭЖХ определений 5-Н-4,6-ДХБФО, 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и их родственных примесей ($n = 10$)

Компонент	λ , нм	Диапазон концен- траций, мкг/мл	$S = a + bc$		R^2	Предел детекти- рования, мкг/мл	Предел коли- чественного определения, мкг/мл
			b	a			
4,6-ДН-5,7-ДХБФО	400	2 – 200	29316	1525	0.9999	0.05	0.16
5-Н-4,6-ДХБФО	400	2 – 100	23122	1213	0.9999	0.04	0.12
1,3-Динитро- 2,4,6-трихлорбензол	245	0.5 – 160	17918	506	0.9998	0.17	0.56
3,5-Дихлор- 2,4,6-тринитро- 1-азидобензол	245	0.5 – 160	49380	-740	0.9998	0.05	0.16

Устойчивость аналитических характеристик методики ВЭЖХ определения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО и технологических примесей в них устанавливали путем сравнения площадей пиков свежеприготовленных растворов и растворов после хранения при комнатной температуре. Концентрация аналитов отклоняется от первоначального значения не более чем на 2 % при условиях хранения в течение 8 ч.

Правильность аналитических определений устанавливали по результатам применения методики к анализу модельной смеси, включающей известное количество определяемых веществ при шести параллельных определениях. Представленные в табл. 3 результаты демонстрируют согласованность найденных содержаний аналитов по отношению к введенным количествам.

Табл. 3

Оценка правильности методики ВЭЖХ анализа смеси компонентов синтеза производных бензофураксана ($n = 6$)

Соединение	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	R , %	s_r , %
4,6-ДН-5,7-ДХБФО	50.35	50.5 ± 0.3	100	0.65
5-Н-4,6-ДХБФО	50.87	50.7 ± 0.3	99.6	0.59
1,3-Динитро-2,4,6-трихлорбензол	1.06	1.10 ± 0.04	104	3.64
3,5-Дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидобензол	1.14	1.17 ± 0.03	103	2.56

В табл. 4 приведены результаты анализа лекарственных форм хлорнитро-производных бензофураксана, полученных в результате физического смешения компонентов. Результаты демонстрируют отсутствие мешающего влияния

вспомогательных компонентов лекарственных форм на результаты определения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО в биологически активных смесях.

Табл. 4

Результаты хроматографического определения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО в лекарственных формах ($n = 4$, $P = 0.95$)

Состав смеси, введено компонента (масс. %)	Найдено компонента, %	s_r
5-Н-4,6-ДХБФО (30.6)	30 ± 2	0.04
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (50.2)	50 ± 5	0.05
5-Н-4,6-ДХБФО (60.5)	60 ± 4	0.04
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (30.2)	30 ± 3	0.06
5-Н-4,6-ДХБФО (80.7)	80 ± 6	0.04
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (15.4)	15.2 ± 0.1	0.04
5-Н-4,6-ДХБФО (93.3)	94 ± 9	0.05
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (5.1)	5.1 ± 0.4	0.04
5-Н-4,6-ДХБФО (0.28)	0.26 ± 0.02	0.05
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (0.20)	0.19 ± 0.02	0.05
Полиэтиленгликоль 400 (79.7)		
Полиэтиленгликоль 1500 (16.9)		
Диметилсульфоксид (2.8)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0.45)	0.57 ± 0.05	0.05
Полиэтиленгликоль 400 (80.0)		
Полиэтиленгликоль 1500 (16.2)		
Диметилсульфоксид (2.8)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0.25)	0.24 ± 0.03	0.06
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (0.2)	0.22 ± 0.02	0.06
Неонол (1.5)		
Вазелиновое масло (97.5)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0.45)	0.49 ± 0.05	0.05
Стеарокс 6 (1.0)		
Персиковое масло (98)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0.5)	0.52 ± 0.05	0.05
Моноалкилфениловые эфиры полиэ- тиленгликоля ОП-7, ОП-10 (1.4)		
Дистиллированная вода (98)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0.35) в этаноле	0.32 ± 0.03	0.05

На основе разработанной методики также проведен анализ чистоты субстанций хлорнитропроизводных бензофуроксана, а также различных смесей, полученных как в результате соблюдения технологической схемы синтеза, так и при отклонениях от лабораторного регламента. Наличие технологических примесей на стадиях азидирования и нитрования позволяет достоверно выявить несоблюдение условий синтеза 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО. Нарушение условий азидирования приводит к появлению высоких содержаний в образцах 1-нитро-2,4,6-трихлорбензола, который в условиях нитрования приводит к образованию 1,3-динитро-2,4,6-трихлорбензола. При нарушении условий нитрования увеличивается содержание 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидобензола, что при-

водит к изменению показателей качества 5-Н-4,6-ДХБФО, 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и, соответственно, влияет на биологически активные свойства этой смеси.

Заключение

Впервые предложен способ одновременного определения 4,6-ДН-5,7-ДХБФО, 5-Н-4,6-ДХБФО, а также технологических примесей их синтеза в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Скрининг хроматографических колонок показал эффективность использования амидной фазы в сочетании с изократическим элюированием смесью ацетонитрил – метанол, содержащей 0.05%-ную H_3PO_4 , для решения аналитических задач. Достигнутые характеристики хлорнитропроизводных бензофуроксана позволяют осуществлять контроль технологического цикла их получения, включая стадии нитрования и термодиклизации, и устанавливать при этом компонентный состав полученных лекарственных смесей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Хмельницкий Л.И., Новиков С.С., Годовикова Т.И. Химия фуранов. Строение и синтез. М.: Наука, 1996. 383 с.
2. Хмельницкий Л.И., Новиков С.С., Годовикова Т.И. Химия фуранов. Реакции и применение. М.: Наука, 1996. 384 с.
3. Cerecetto H., González M. Benzofuroxan and furoxan. Chemistry and biology // Khan M.T.H. (Ed.) Bioactive Heterocycles IV. V. 10. Ser.: Topics in Heterocyclic Chemistry. V. 10. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007. P. 265–308. https://doi.org/10.1007/7081_2007_064.
4. Cerecetto H., Porcal W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: Recent developments // Mini-Rev. Med. Chem. 2005. V. 5, No 1. P. 57–71. <https://doi.org/10.2174/1389557053402864>.
5. Галкина И.В., Тахаутдинова Г.Л., Губайдуллин А.Т., Гнездилов О.И., Юсупова Л.М., Сахибуллина В.Г., Ильясов А.В., Галкин В.И. Синтез, строение и биологическая активность антимикробных соединений на основе дихлординитробензофуроксана и ароматических аминов / Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2014. Т. 156, кн. 2. С. 24–36.
6. Галкина И.В., Юсупова Л.М., Бахтияров Д.И., Герасимов А.В., Исламов Д.Р., Литвинов И.А., Бахтиярова Ю.В. Синтез, молекулярная и кристаллическая структура 4,6-динитро-5,7-дихлор-2,1,3-оксадиазол-1-оксида // Журн. общ. химии. 2022. Т. 92, № 12. С. 1819–1825. <https://doi.org/10.31857/S0044460X22120010>.
7. Чугунова Е.А., Газизов А.С., Бурилов А.Р., Юсупова Л.М., Пудовик М.А., Синяшин О.Г. Бензофуроксаны: их синтез, свойства и биологическая активность // Изв. АН. Сер. хим. 2019. Т. 68, № 5. С. 887–910.
8. Юсупова Л.М., Гармонов С.Ю., Захаров И.М., Быков А.Р., Фаляхов И.Ф., Гарипов Т.В. Фунгицидные и токсикологические свойства функционально замещенных нитробензофуроксанов // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42, № 4. С. 27–29.
9. Jovené C.C., Chugunova E.A., Goumont R. The properties and the use of substituted benzofuroxans in pharmaceutical and medicinal chemistry: A comprehensive review // MiniRev. Med. Chem. 2013. V. 13, No 8. P. 1089–1136. <https://doi.org/10.2174/1389557511313080001>.
10. Chugunova E., Gibadullina E., Matylitsky K., Bazarbayev B., Neganova M., Volcho K., Rogachev A., Akylbekov N., Nguyen H.B.T., Voloshina A., Lyubina A., Amerhanova S., Syakaev V., Burilov A., Appazov N., Zhanakov M., Kuhn L., Sinyashin O., Alabugin I.

- Diverse biological activity of benzofuroxan/sterically hindered phenols hybrids // *Pharmaceuticals*. 2023. V. 16, No 4. Art. 499. <https://doi.org/10.3390/ph16040499>.
11. Chugunova E., Frenna V., Consiglio G., Micheletti G., Boga C., Akylbekov N., Burilov A., Spinelli D. On the nucleophilic reactivity of 4,6-dichloro-5-nitrobenzofuroxan with some aliphatic and aromatic amines: Selective nucleophilic substitution // *J. Org. Chem.* 2020. V. 85, No 21. P. 13472–13480. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01502>.
 12. Chugunova E., Akylbekov N., Dobrynin A., Burilov A., Boga C., Micheletti G., Frenna V., Mattioli E.J., Calvaresi M., Spinelli D. 4,6-Dichloro-5-nitrobenzofuroxan: Different polymorphisms and DFT investigation of its reactivity with nucleophiles // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22, No 24. Art. 13460. <https://doi.org/10.3390/ijms222413460>.
 13. Ramazani A., Karimi M., Hosseinzadeh Z., Rezayati S., Hanifehpour Y., Joo S.W. Syntheses and antitumor properties of furoxan derivatives // *Curr. Org. Chem.* 2021. V. 25, No 7. P. 757–778. <https://doi.org/10.2174/1385272825666210208183751>.
 14. Ingold M., de la Sovera V., Dapuetto R., Hernández P., Porcal W., López G.V. Greener synthesis of antiproliferative furoxans via multicomponent reactions // *Molecules*. 2022. V. 27, No 6. Art. 1756. <https://doi.org/10.3390/molecules27061756>.
 15. Mu Li, Feng S.-S., Go M.L. Study of synthesis and cardiovascular activity of some furoxan derivatives as potential NO-donors // *Chem. Pharm. Bull.* 2000. V. 48, No 6. P. 808–816. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.808>.
 16. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузовская книга, 2004. 360 с.
 17. Patil A.S., Pethe A.M. Quality by Design (QbD): A new concept for development of quality pharmaceuticals // *Int. J. Pharm. Qual. Assur.* 2013. V. 4, No 2. P. 13–19.
 18. Lawrence X.Yu. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control // *Pharm. Res.* 2008. V. 25, No 4. P. 781–791. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9511-1>.
 19. Гармонов С.Ю., Юсупова Л.М., Якупова А.С., Фалыхов И.Ф., Сопин В.Ф. Спектрофотометрическое и хроматографическое определение 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуроксана в биологически активной смеси // *Хим.-фарм. журн.* 2003. Т. 37, № 4. С. 52–53.
 20. Юсупова Л.М., Бузыкин Б.И., Молодых Ж.В., Фалыхов И.Ф., Абдрахманов И.Ш., Хисамутдинов Г.Х., Беляев П.Г., Угрюмова В.С., Равилов А.З., Юсупова Г.Р., Шарнин Г.П., Булидоров В.В., Свиридов С.И., Анисимова Н.Н. Способ получения смеси 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофуроксанов и смесь 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофуроксанов, обладающей бактерицидной, вирулицидной и спороцидной активностью. Патент РФ на изобретение № 2051913. 1996. Бюл. изобр. № 1.
 21. Neue U.D. HPLC Columns: Theory, Technology and Practice. New York, NY: Wiley, 1997. 416 p.
 22. LoBrutto R., Kazakevich Y. Chapter 4 – Reversed-phase HPLC // Kazakevich Y., LoBrutto R. (Eds.) HPLC for Pharmaceutical Scientists. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. P. 139–239. <https://doi.org/10.1002/9780470087954.ch4>.
 23. Aral H., Aral T., Çelik K.S., Ziyadanoğulları B., Ziyadanoğulları R. HPLC separation of different groups of small polar compounds on a novel amide-embedded stationary phase // *Chromatographia*. 2014. V. 77, No 11–12. P. 771–781. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2678-9>.

Гармонов Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, 420015, Россия
E-mail: *serggar@mail.ru*

Салахов Ильгиз Анясович, кандидат химических наук, ведущий инженер

ООО «Нанофарма девелопмент»
ул. Восстания, д. 102в, г. Казань, 420095, Россия
E-mail: *hplc8@mail.ru*

Юсупова Луиза Магдануровна, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры химии и технологии органических соединений азота

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, 420015, Россия
E-mail: *luizamagdanurovna@yandex.ru*

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 3, pp. 387–400

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.3.387-400

Determination of Biologically Active Chloro-Nitro-Substituted Benzofuroxans by High-Performance Liquid Chromatography

S.Yu. Garmonov^{a}, I.A. Salakhov^{b**}, L.M. Yusupova^{a***}*

^aKazan National Research Technological University, Kazan, 420015 Russia

^bООО “Nanopharma Development”, Kazan, 420095 Russia

E-mail: ^{*}*serggar@mail.ru*, ^{**}*hplc8@mail.ru*, ^{***}*luizamagdanurovna@yandex.ru*

Received April 4, 2024; Accepted May 4, 2024

Abstract

Chloro-nitro-derivatives of benzofuroxan are compounds exhibiting pronounced biological (anti-bacterial, fungicidal, and NO-donor) and other types of activities along with low toxicity. For further pharmaceutical development and dosage form design based on them, effective quality control methods that allow the selective and sensitive detection of active ingredients are needed. Here, for 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan (4,6-DN-5,7-DCBF), 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan (5-N-4,6-DCBF), and process-related impurities of their synthesis, a method for the simultaneous determination of analytes by high-performance liquid chromatography with diode matrix detection was introduced. The chromatographic behavior of the analytes was studied using different reversed phases. The separation of the components was successful with amide and nitrile phases. Optimal conditions for the chromatographic separation were established using the Discovery RP Amide C16 (4.6×250 mm) columns and the isocratic elution with a mixture of 0.05 % H₃PO₄ – acetonitrile – methanol (51:34:15, vol. %) at the detection wavelengths of 245 and 207 nm. The linearity of the calibration graphs was achieved in the range of 0.5–200 µg/mL with the detection limits up to 0.12 µg/mL. The developed method was applied for the purification of chloro-nitro-derivatives of benzofuroxan in the mixtures and dosage forms based on them.

Keywords: high-performance liquid chromatography, 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan, 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan, product- and process-related impurities, quality control, dosage forms

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

- Fig. 1. Structural formulas of the chloro-nitro-derivatives of benzofuroxan under consideration.
- Fig. 2. Absorption spectra of 4,6-DN-5,7-DCBF (1), 5-N-4,6-DCBF (2), 1,3-dinitro-2,4,6-trichlorobenzene (3), and 3,5-dichloro-2,4,6-trinitro-1-azidobenzene (4) according to the diode array detector in the mobile phase: 0.5 % H_3PO_4 – acetonitrile (70:30, vol. %).
- Fig. 3. Chromatogram of 100 $\mu\text{g/mL}$ 5-N-4,6-DCBF (1) and 4,6-DN-5,7-DCBF (2). Column: Spheri-5 CYANO 110 – 5, 4.6×220 mm. Eluent: 0.05 % CF_3COOH – acetonitrile (40:60, vol. %). Detection at $\lambda = 390$ nm. Column temperature 25 $^\circ\text{C}$.
- Fig. 4. Chromatogram of 5-N-4,6-DCBF (1), 4,6-DN-5,7-DCBF (2), 1,3-dinitro-2,4,6-trichlorobenzene (3), and 3,5-dichloro-2,4,6-trinitro-1-azidobenzene (4) at the concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$. Column: Discovery RP Amide C16, 4.6×250 mm. Detection wavelength 245 nm (a), 207 nm (b). Eluent: 0.05 % H_3PO_4 – acetonitrile – methanol (51:34:15, vol. %). Column temperature 50 $^\circ\text{C}$.

References

1. Khmel'nitskii L.I., Novikov S.S., Godovikova T.I. *Khimiya furoksanov. Stroenie i sintez* [Chemistry of Furoxanes. Structure and Synthesis]. Moscow, Nauka, 1996. 383 p. (In Russian)
2. Khmel'nitskii L.I., Novikov S.S., Godovikova T.I. *Khimiya furoksanov. Reaktsii i primeneniye* [Chemistry of Furoxanes. Reactions and Applications]. Moscow, Nauka, 1996. 384 p. (In Russian)
3. Cerecetto H., González M. Benzofuroxan and furoxan. Chemistry and biology. In: Khan M.T.H. (Ed.) *Bioactive Heterocycles IV*. Ser.: Topics in Heterocyclic Chemistry. Vol. 10. Berlin, Heidelberg, Springer, 2007. pp. 265–308. https://doi.org/10.1007/7081_2007_064.
4. Cerecetto H., Porcal W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: Recent developments. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2005, vol. 5, no. 1, pp. 57–71. <https://doi.org/10.2174/1389557053402864>.
5. Galkina I.V., Takhautdinova G.L., Gubaidullin A.T., Gnezdilov O.I., Yusupova L.M., Sakhibullina V.G., Ilyasov A.V., Galkin V.I. Synthesis, structure and biological activity of antimicrobial compounds based on dichlorodinitrobenzofuroxan and aromatic amines. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2014, vol. 156, no. 2, pp. 24–36. (In Russian)
6. Galkina I.V., Yusupova L.M., Bakhtiyarov D.I., Gerasimov A.V., Islamov D.R., Litvinov I.A., Bakhtiyarova Yu.V. Synthesis, molecular, and crystal structure of 4,6-dinitro-5,7-dichloro-2,1,3-oxadiazole-1-oxide. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2022, vol. 92, no. 12. pp. 2555–2560. <https://doi.org/10.1134/S1070363222120015>.
7. Chugunova E.A., Gazizov A.S., Burilov A.R., Yusupova L.M., Pudovik M.A., Sinyashin O.G. Benzofuroxans: Their synthesis, properties, and biological activity. *Russ. Chem. Bull.*, 2019, vol. 68, no. 5, pp. 887–910. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2503-6>.
8. Yusupova L.M., Garmonov S.Yu., Zakharov I.M., Bykov A.R., Falyakhov I.F., Garipov T.V. Fungicidal and toxicological properties of functionally substituted nitrobenzofuroxanes. *Pharm. Chem. J.*, 2008, vol. 42, no. 4, pp. 183–185. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0097-7>.
9. Jovené C.C., Chugunova E.A., Goumont R. The properties and the use of substituted benzofuroxans in pharmaceutical and medicinal chemistry: A comprehensive review. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2013, vol. 13, no. 8, pp. 1089–1136. <https://doi.org/10.2174/1389557511313080001>.
10. Chugunova E., Gibadullina E., Matylytsky K., Bazarbayev B., Neganova M., Volcho K., Rogachev A., Akylbekov N., Nguyen H.B.T., Voloshina A., Lyubina A., Amerhanova S., Syakaev V., Burilov A., Appazov N., Zhanakov M., Kuhn L., Sinyashin O., Alabugin I. Diverse biological activity of benzofuroxan/sterically hindered phenols hybrids. *Pharmaceuticals*, 2023, vol. 16, no. 4, art. 499. <https://doi.org/10.3390/ph16040499>.
11. Chugunova E., Frenna V., Consiglio G., Micheletti G., Boga C., Akylbekov N., Burilov A., Spinelli D. On the nucleophilic reactivity of 4,6-dichloro-5-nitrobenzofuroxan with some aliphatic and aromatic amines: Selective nucleophilic substitution. *J. Org. Chem.*, 2020, vol. 85, no. 21, pp. 13472–13480. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01502>.
12. Chugunova E., Akylbekov N., Dobrynin A., Burilov A., Boga C., Micheletti G., Frenna V., Mattioli E.J., Calvaresi M., Spinelli D. 4,6-Dichloro-5-nitrobenzofuroxan: Different polymorphisms and DFT

- investigation of its reactivity with nucleophiles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 24, art. 13460. <https://doi.org/10.3390/ijms222413460>.
13. Ramazani A., Karimi M., Hosseinzadeh Z., Rezayati S., Hanifehpour Y., Joo S.W. Syntheses and antitumor properties of furoxan derivatives. *Curr. Org. Chem.*, 2021, vol. 25, no. 7, pp. 757–778. <https://doi.org/10.2174/1385272825666210208183751>.
 14. Ingold M., de la Sovera V., Dapuetto R., Hernández P., Porcal W., López G.V. Greener synthesis of antiproliferative furoxans via multicomponent reactions. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 6, art. 1756. <https://doi.org/10.3390/molecules27061756>.
 15. Mu Li, Feng S.-S., Go M.L. Study of synthesis and cardiovascular activity of some furoxan derivatives as potential NO-donors. *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, vol. 48, no. 6, pp. 808–816. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.808>.
 16. Granik V.G., Grigoriev N.B. *Oksid azota (NO). Novyi put' k poisku lekarstv* [Nitric Oxide (NO). A New Way to Discover Medicines]. Moscow, Vuz. Kniga, 2004. 360 p. (In Russian)
 17. Patil A.S., Pethe A.M. Quality by Design (QbD): A new concept for development of quality pharmaceuticals. *Int. J. Pharm. Qual. Assur.*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 13–19.
 18. Lawrence X.Yu. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. *Pharm. Res.*, 2008, vol. 25, no. 4, pp. 781–791. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9511-1>.
 19. Garmonov S.Yu., Yusupova L.M., Yakupova A.S., Falyakhov I.V., Sopin V.F. Spectrophotometric and chromatographic determination of 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxane in biologically active mixtures. *Pharm. Chem. J.*, 2003, vol. 37, no. 4, pp. 214–216. <https://doi.org/10.1023/A:1024790929892>.
 20. Yusupova L.M., Buzykin B.I., Molodykh Zh.V., Falyakhov I.F., Abdrakhmanov I.Sh., Khisamutdinov G.Kh., Belyaev P.G., Ugryumova V.S., Ravilov A.Z., Yusupova G.R., Sharnin G.P., Bulidorov V.V., Sviridov S.I., Anisimova N.N. A method for the preparation of a mixture of 4-nitro and 6-nitro-5,7-dichlorobenzofuroxanes and a mixture of 4-nitro- and 6-nitro-5,7-dichlorobenzofuroxanes with bactericidal, viricidal and sporicidal activity. Patent RF no. 2051913. *Byull. Izobr.*, 1996, no. 1. (In Russian)
 21. Neue U.D. *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*. New York, NY, Wiley, 1997. 416 p.
 22. LoBrutto R., Kazakevich Y. Chapter 4 – Reversed-phase HPLC. In: Kazakevich Y., LoBrutto R. (Eds.) *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, 2007. pp. 139–239. <https://doi.org/10.1002/9780470087954.ch4>.
 23. Aral H., Aral T., Çelik K.S., Ziyadanoğulları B., Ziyadanoğulları R. HPLC separation of different groups of small polar compounds on a novel amide-embedded stationary phase. *Chromatographia*, 2014, vol. 77, nos. 11–12, pp. 771–781. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2678-9>.

⟨ Для цитирования: Гармонов С.Ю., Салахов И.А., Юсупова Л.М. Определение биологически активных хлорнитрозамещенных бензофуроксанов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 3. С. 387–400. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.3.387-400>. ⟩

⟨ For citation: Garmonov S.Yu., Salakhov I.A., Yusupova L.M. Determination of biologically active chloro-nitro-substituted benzofuroxans by high-performance liquid chromatography. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 3, pp. 387–400. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.3.387-400>. (In Russian) ⟩