Федеральное государственное автономное образовательное учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

На правах рукописи

Кургачев Дмитрий Андреевич

РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКОЛУРИЛА, ЕГО *N*-МЕТИЛЬНЫХ И *N*-МЕТИЛОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ – СИНТОНОВ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

02.00.02 Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Бакибаев Абдигали Абдиманапович

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 Методы анализа гликолурила и его производных. Литературный обзор	7
1.1 Общие сведения об объекте исследования	7
1.2 Спектральные методы анализа	10
1.3 Электрохимические методы анализа	23
1.4 Химические методы анализа	24
1.5 Хроматографические методы анализа	24
2 Обсуждение результатов	33
2.1 Методология разработки хроматографического разделения производных гликолурила	33
2.2 Разработка методики анализа родственных примесей гликолурила	40
2.3 Разработка методик анализа гликолурила и его <i>N</i> -метилпроизводных	52
2.4 Разработка методики анализа <i>N</i> -метилолпроизводных гликолурила	71
3 Экспериментальная часть	88
3.1 Реактивы, материалы и оборудование	88
3.2 Методики анализа	89
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	95
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99

введение

Актуальность темы исследования

Бицикликлические бисмочевины (гликолурилы) используются в качестве синтонов для получения ряда важнейших супрамолекулярных соединений, перспективных биологическиактивных веществ и ряда соединений с большой практической ценностью. На основе гликолурила его производных могут быть созданы вещества с уникальными И контролируемыми свойствами – кукурбитурилы, бамбусурилы, тиараурилы, «молекулярные зажимы» [1; 2; 3; 4] и др. Гликолурил и материалы на его основе исследуют в качестве компонентов органических полупроводниковых материалов [5], вспомогательных веществ лекарственных препаратов: пролонгаторов и молекулярных контейнеров контролируемого высвобождения [6; 7; 8], материалов co свойствами «молекулярного узнавания» и молекулярных сенсоров для экспрессного анализа амфифильных компонентов: поверхностноактивных веществ, бактериальных эндотоксинов и биогенных аминов [9; 10; 11]. В настоящее *N*-метильных *N*-метилольных время на основе гликолурила, его И производных в промышленных масштабах изготавливают лекарственные препараты [12], взрывчатые вещества [13; 14; 15; 16] и сшивающие агенты для производства полимеров специального назначения [17; 18].

Существенным качеством гликолурила и его метилпроизводных является крайне низкая токсичность и отсутствие канцерогенных свойств [19; 20; 21]. Для использования гликолурила и его производных в супрамолекулярной химии, микроэлектронике, для синтеза перспективных фармакологически активных веществ и «молекулярных машин», необходимо строго контролировать качество исходного гликолурила, в особенности содержание примесей, близкородственных соединений и изомеров, для чего необходимо разработать эффективные методики анализа гликолурила, его *N*-метильных и *N*-метилольных производных.

Степень разработанности темы исследования

В открытой научной литературе не описано надежных методов количественного определения гликолурила, его примесей и родственных соединений, а также *N*-метили *N*-метилолпроизводных. Основные труды, посвященные гликолурилу и близкородственным веществам касаются вопросов синтеза и исследования некоторых физико-химических свойств, при этом в настоящее время проблема анализа примесей гликолурила не решена: крупнейшие производители проводят анализ его чистоты с использованием элементного анализа. *Цель работы* – разработать методики анализа гликолурила, его родственных примесей, *N*-метил- и *N*-метилолпроизводных методом жидкостной хроматографии. Для достижения поставленной цели сформулированы и решены следующие *задачи*:

1. Разработать методику хроматографического разделения родственных примесей гликолурила;

2. Идентифицировать ключевые примеси гликолурила;

3. Разработать способ препаративного выделения изомерно чистых *N*,*N*'-диметилгликолурилов, и установить их структуру;

4. Установить оптимальные условия ВЭЖХ-разделения и определения гликолурила и его *N*-метилпроизводных.

5. Идентифицировать *N*-метилольные производные гликолурила и разработать методику их анализа.

Научная новизна

Разработаны и оптимизированы экспрессные методики анализа гликолурила, его родственных примесей, *N*-метил-И *N*-метилолпроизводных методом жидкостной хроматографии. Оценены метрологические характеристики разработанных методик анализа. Идентифицированы ключевые, в том числе две ранее не описанные в литературе, родственные примеси гликолурила методом хромато-масс-спектрометрии. Разработана методика хроматографического препаративного разделения и выделения в виде индивидуальных веществ изомеров N,N'-диметилгликолурила; структура выделенных изомеров подтверждена методами ЯМР-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии.

Практическая значимость работы заключается в возможности использования полученных результатов в проведении анализа гликолурила, его *N*-метилол и *N*-метилпроизводных методом жидкостной хроматографии на всех этапах производства соответствующих веществ. Значительная часть результатов диссертационной работы использована при проведении специального курса «Выделение и идентификация примесей лекарственных фармацевтических субстанциях И препаратах» для работников В фармацевтической и химической промышленности, а также при составлении магистерского курса «Физико-химические методы анализа органических соединений и фармацевтических субстанций».

Разработанная методика хроматографического препаративного разделения и выделения изомерно чистых *N*,*N*'-диметилпроизводных гликолурила используется в Лаборатории органического синтеза Томского государственного университета для получения высокочистых образцов *N*,*N*'-диметилгликолурилов, применяемых в качестве синтонов для получения новых гетерофункциональных соединений.

Положения, выносимые на защиту

1. Методика анализа родственных примесей гликолурила методом ВЭЖХ.

2. Способ препаративного выделения изомерно чистых *N*,*N*'-диметилгликолурилов из реакционной смеси методом препаративной ВЭЖХ.

3. Условия хроматографического экспрессного разделения и одновременного определения гликолурила и его *N*-метил-производных.

4. Методика экспрессного анализа *N*-метилолпроизводных гликолурила.

5. Результаты идентификации примесей и *N*-замещенных производных гликолурила методом хромато-масс-спектрометрии.

Достоверность результатов работы подтверждается тем, что данные получены с использованием современного аналитического оборудования, прошедшего своевременную метрологическую поверку. Идентификация соединений и подтверждение их структуры проведены с использованием инструментальных физико-химических методов анализа. Проведена оценка метрологических характеристик разработанных методик; методики анализа апробированы на реальных исследуемых объектах.

Работа выполнена автором или при непосредственном участии автора. Личный вклад автора заключается в планировании и разработке дизайна экспериментов, непосредственном проведении исследований, получении и интерпретации данных, оформлении результатов исследований, подготовке публикаций и текста диссертации.

Апробация результатов

Результаты работ представлены на XIII Международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2016) и XIV Международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2017).

Публикации по результатам работы

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, входящих в наукометрические базы данных Scopus и Web of Science, а также тезисы четырех докладов, представленных на международных научных конференциях. Результаты работы защищены двумя патентами РФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научнотехнологического комплекса России на 2014–2020 годы», Соглашение № 05.604.21.0251, уникальный идентификатор работ RFMEFI60419X0251. Автор выражает благодарность:

- сотрудникам Лаборатории органического синтеза ТГУ: заведующему лаборатории, к.х.н. В.С. Малькову за организацию работ по синтезу исследуемых соединений; м.н.с. С.И. Горбину за синтез гликолурила, 2,8-диметилгликолурила, тетраметилгликолурила и тетраметилолгликолурила; с.н.с., к.х.н. Н.Ю. Селиховой за помощь в проведении экспериментов и обработке результатов; м.н.с. В.Р. Кущербаевой за синтез смеси 2,4- и 2,6-диметилгликолурила;

- сотрудникам Лаборатории физико-химических методов анализа ТГУ: заведующему лаборатории Д.В. Новикову за помощь в работе и организацию образовательных курсов; м.н.с. О.А. Котельникову за получение ЯМР-спектров; м.н.с. Н.Б. Дементьевой за помощь в получении масс-спектров высокого разрешения; м.н.с. Е.В. Томиловой за синтез монометилгликолурила;

- сотруднику Лаборатории каталитических исследований ТГУ с.н.с., к.х.н. М.А. Салаеву за помощь в подготовке публикаций и консультационную поддержку.

1 Методы анализа гликолурила и его производных. Литературный обзор

1.1 Общие сведения об объекте исследования

В химии азотсодержащих гетероциклических соединений особое место занимают бициклические бисмочевины, среди которых наибольший интерес вызывает 2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0.]октан-3,7-дион **1** (гликолурил) и его производные. Структурная формула и пространственная конфигурация гликолурила изображены на Рисунке 1



Рис. 1.1 – Структурная формула гликолурила **1** (1а) и его пространственная конфигурация в кристалле (1b)

Химия гликолурилов, прежде всего, благодаря полифунциональности их структуры, претерпела бурное развитие, что нашло отражение в создании на их основе ценных веществ в различных сферах человеческой деятельности: противоопухолевых лекарственных средств [22; 23; 24; 25], его производные применяют в качестве стабилизаторов и антипиретиков при производстве резин [26], сшивающих агентов [27], модификаторов волокон при производстве тканей [28], консервантов и бактерицидных средств [29; 30], и модификаторов свойств древесины [31]. В настоящее время гликолурил 1 является важнейшим компонентом для получения ряда макроциклических соединений: молекулярных клипс, бамбус[*n*]урилов, тиара[n]урилов и нескольких классов кукурбит[n]урилов. Среди подобных производных гликолурила есть реагенты, нашедшие применение в генетических исследованиях [32; 33], в экспресс-анализе гликолипидов [34] и биогенных аминов [35]. *N*-Метилольные производные гликолурила применяют при производстве органических тонкопленочных элементов микроэлектроники Ha супрамолекулярных производных [36]. основе гликолурила разрабатывают новые перспективные таргетные противоопухолевые [37] и антибактериальные

[38] и другие [39] лекарственные средства. Кроме того, на основе гликолурила изготавливают пористые адсорбенты [40], взрывчатые вещества [41; 42; 43; 44], органические региоселективные катализаторы [45; 46]. Свободный гликолурил применяют как катализатор селективного перекисного окисления в тонком органическом синтезе биологически активных веществ [47]. Несомненным достоинством самого гликолурила **1** является то, что в отсутствии примесей он нетоксичен и не канцерогенен [19; 20; 21].

Гликолурил 1 – полифункциональное соединение, в котором карбамидный фрагмент, фактически, определяет свойства, обусловленные наличием двух реакционных центров в составе молекулы: четыре донорные группы –NH и две акцепторные –C=O. Прямые методы анализа гликолурила 1 базируются на его свойствах весьма активного *n*-нуклеофила и существенно дезактивированного *p*-нуклеофила. С другой стороны, молекула 1 имеет две плоскости симметрии σ^1 и σ^2 , где плоскость σ^1 проходит вдоль метинового CH–CH мостика, а плоскость σ^2 пересекает два карбонильных атома кислорода. Положение осей и плоскостей симметрии гликолурила представлены на Рисунке 1.2 [48].



Рис. 1.2 – Плоскости симметрии σ^1 и σ^2 в молекуле гликолурила **1**

Однако при изучении кристаллической структуры гликолурила 1 методом PCA (рис. 1b), впервые было установлено [49], что помимо симметрии, конформация бициклического каркаса 1 из-за жесткости *цис*-сочленения аннелированных имидазолидиноновых циклов обладает складчатой структурой в виде «полураскрытой книги», где диэдральный угол между имидазолиноновыми циклическими фрагментами в молекуле 1 составляет 124,1°. Кроме того, установлено, что атомы азота в молекуле 1 расположены равноудаленно друг от друга. Атомы водорода при метиновых атомах углерода имеют *цис*-ориентацию, а имидазолидиноновые циклы характеризуются почти плоским строением с небольшим отклонением карбонильных групп от средней плоскости.

Существенным ограничивающим условием для эффективного аналитического определения гликолурила является его низкая растворимость в воде и органических растворителях, хотя большинство *N*-замещенных производных гликолурила лишены этого недостатка. Подробная информация о свойствах гликолурила представлена в Таблице 1.

Γ			
Параметр	Значение		
Температура плавления	360°С, плавится с разложением		
Растворимость:	Не растворим в галогенуглеводородах, спиртах, кетонах, эфирах, при нагревании растворим в ДМСО, ДМФА, НСООН, АсОН, Ас ₂ О, H ₂ O		
ИК-спектр, v, см ⁻¹ :	(KBr): 3209 (NH), 1675 (C=O)		
ЯМР ¹ Н (400 МГц, δ, ДМСО-d ₆ , ppm)	5,24 (c, 2H, CH), 7,16 (c, 4H, NH)		
ЯМР ¹³ С (100 МГц, δ, ДМСО-d ₆ , ppm)	160,30 (C=O), 64,60 (CH)		

Таблица 1.1 – Физико-химические характеристики гликолурила (1)

Кроме того, благодаря широкому применению гликолурила **1** и его производных, возникает необходимость в аналитических методиках определения гликолурила и его родственных примесей, а также наиболее широко применяемых производных: *N*-метильных и *N*-метилольных производных.

Достоверно известно. таргетном гликолуриле **1** могут что в содержаться близкородственные например, вещества, такие как, гидантоин [50] И другие неидентифицированные примеси [51]. При этом, в открытой литературе нет полной информации о профиле примесей и методиках их количественного определения; также в литературе не приводится надежных методов количественного определения гликолурила. Производители/поставщики гликолурила Sigma/Merck и Acros Organics нормируют элементный состав (%C, %N) [52]. Однако, поскольку родственные примеси гликолурила зачастую имеют схожий элементный состав, то элементный анализ не может служить для однозначной оценки чистоты целевого соединения.

В настоящее время для анализа гликолурила **1**, его N- и C-производных и их родственных соединений применяют ряд методов анализа, которые позволяют получить

значительное количество информации о структуре и свойствах этих веществ. Ниже нами приведены основные методы анализа гликолурилов и соединений, синтезируемых на их базе, в ходе изложения которых критически рассмотрены достоинства и недостатки предлагаемых методов.

1.2 Спектральные методы анализа

Спектральные методы анализа находят применение для исследования и анализа гликолурила **1** и его производных. Для исследования структуры и свойств гликолурила применяют большое число разновидностей спектральных методов анализа: спектроскопию в ультрафиолетовой (УФ-), видимой, инфракрасной области (ИК-), спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрию (МС) и реже другие варианты спектрального анализа.

Спектроскопия в инфракрасной области – один из наиболее широко применяемых методов анализа гликолурилов, основанный на изучении взаимодействия вещества с инфракрасным излучением. Для анализа производных гликолурила чаще всего применяют спектроскопию в средней области излучения – от 2 500 до 25 000 нм (от 400 до 4000 см⁻¹).

ИК-спектроскопию используют для идентификации и подтверждения структуры гликолурила [53; 54], его олигомеров [55; 56], полимеров [40], макроциклических производных – кукурбитурилов [57], N-алкильных производных [58], С-аминопроизводных [59], кремнийорганических [60], фосфорилированных [61] и полифункциональных производных гликолурила сложного состава [62]. Корме того, известны примеры анализа подлинности различных *N*-нитропроизводных гликолурила: моно-, ди-, три-, тетранитрогликолурилов и нитрофенильных производных [63] методом ИК-спектроскопии в диске из калия бромида и методом ИК-спектроскопии неполного внутреннего отражения (*DATR FTIR*).

На ИК-спектре производных гликолурила, представленном на Рисунке 1.3, присутствуют характеристические сигналы колебаний химических связей, входящих в структуру гликолурила. Расшифровка основных полос поглощения приведена в Таблице 1.2.



Рис. 1.3 – ИК-спектр гликолурила

Таблица 1.2 – Ключевые полосы поглощения на ИК-спектрах гликолурилов

Волновое число, см ⁻¹	Связь, тип колебаний	Комментарий		
3350-3200	N–H, stretching	Отсутствует в <i>N</i> -тетразамещенных производных		
3000–2048	C–H, stretching	_		
1680	C=O, stretching	Карбонил <i>N</i> -незамещенного фрагмента		
1640	C=O, stretching	Карбонил <i>N</i> -замещенного фрагмента		
1500	C–H, bending	_		
1100	C–N, stretching	_		

Как видно из приведенных данных, приведенных в Таблице 1.2, метод спектроскопии в инфракрасной области позволяет идентифицировать и подтверждать структуру производных гликолурила. Метод позволяет получать информацию о наличии нескольких типов связей и функциональных групп в структуре гликолурилов, приведенных в таблице. Кроме того, ИК-спектроскопия может быть использована для идентификации целевых соединений по принципу «отпечатков пальцев» – при полном совпадении ИК-спектров двух производных гликолурила можно сделать вывод об их полной идентичности.

Недостатками данного метода является его сравнительная недостаточная специфичность, низкая разрешающая способность и невозможность анализировать смеси

близких по структуре веществ. ИК-спектроскопия гликолурилов практически малопригодна для количественного их анализа и малочувствительна к содержанию воды в пробе.

Метод спектрофотометрии в видимой области ограниченно применяют для непрямого количественного определения гликолурила **1** [64]. Так, известен метод основанный на фотометрическом определении продукта реакции гликолурила, арсенита натрия и нитропруссида натрия в присутствии Трилона Б. Однако, химизм реакции в работе не приведен, что существенно затрудняет интерпретацию полученных результатов. Вместе с тем, предложенный метод не обеспечивает хемоселективнсть протекающих процессов и не позволяет анализировать содержание гликолурила в растворе в присутствии его предшественников – мочевины и гидантоина.

Природа аналитического сигнала при прямом спектрофотометрическом определении ароматических производных гликолурила определяется, в первую очередь, спектральными свойствами ароматических заместителей и, в меньшей степени, – свойствами, возникающими за счет *р*-*π*-сопряжения фрагментов замещенных гликолурилов. При этом, как показано в Таблице 1.3, бициклический фрагмент гликолурила практически не влияет на поглощение: общий вид спектра и максимумы поглощения 3-метил-6-фенилгликолурила и предшественника – фенилмочевины, практически совпадают.

Таблица 1.3 – Сравнение положения максимумов поглощения в ультрафиолетовой области 3-метил-6-фенилгликолурила и фенилмочевины

Вещество	Структурная формула	Фрагмент УФ-спектра	Максимумы поглощения, нм	
Фенилмочевина	O NH ₂ NH	UNUSSETURI UNUSSETURI	232 нм 274 нм [65]	
3-метил-6-фенил- гликолурил		ABSORBANCE	217 нм 230 нм 274 нм [66]	

Незамещенный гликолурил **1** в структуре не имеет хромофорных групп, обеспечивающих интенсивное поглощение в области УФ-спектра с длиной волны выше 200–220 нм. Прежде всего, из-за этого метод УФ-спектроскопии применяют в анализе модифицированных гликолурилов, например, фенилпроизводных [66], пиридильных [67] и нафтильных производных [1], благодаря наличию в спектрах соответствующих производных гликолурила аналитических сигналов, возникающих за счет взаимодействия с излучением ароматических фрагментов молекул.

Таким образом, очевидно, что метод УФ-спектроскопии неспецифичен в отношении производных гликолурила и его предшественников – ациклических мочевин, поскольку не позволяет селективно оценивать концентрацию и свойства соответствующих веществ при возможном одновременном их присутствии в смеси. Низкая специфичность метода УФ-спектрофотометрии делает его малопригодным для подтверждения подлинности, идентификации и количественного определения гликолурила **1** и его производных без предварительной пробоподготовки, например, связанной с разделением смесей близкородственных веществ.

Метод флуориметрии отличается от абсорбционной спектроскопии значительно более высокой чувствительностью и специфичностью, что находит применение в анализе некоторых производных гликолурила. Флуориметрию широко применяют для анализа производных гликолурила, способных к флуоресценции или к гашению флуоресценции [68]. Например, в работе [69] исследованы параметры флуоресценции бис-толановых производных получены спектры возбуждения и испускания. гликолурила: Область поглощения рассматриваемых производных гликолурила находится в диапазоне от 200 нм до 350 нм, максимум поглощения 300 нм (переход $\pi \to \pi^*$), область испускания – 400–600 нм, максимумы испускания: 406 нм, 432 нм. В ходе проведенных исследований показано селективное гашение флуоресценции бис-толановых производных гликолурила в присутствии нитрофенолов. Механизм наблюдаемого эффекта, как указано в работе, предположительно может быть связан с одновременным возникновением водородных связей между гидроксильной группой нитрофенола и карбонильной группой гликолурила и π - π -стэкинг-взаимодействием [70]. Любопытно, что фенолы, не содержащие в структуре нитрогруппы, не влияют на изменение интенсивности флуоресценции.

В работе [71] исследована способность дансильных производных гликолурила к флуоресценции в присутствии широкого ряда ионов металлов: Ag^+ , Na^+ , Li^+ , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} . Авторами показано, что существует зависимость интенсивности испускаемого комплексом света от природы металла. Например, установлено, что добавление ионов Cu^{2+} Hg²⁺ приводит к снижению интенсивности флуоресценции, тогда

как Pb²⁺ практически не влияет, а остальные ионы увеличивают интенсивность флуоресценции дансильных производных гликолурила. Предположительно, данные свойства связаны со строением электронной оболочки атомов металлов, их ионным радиусом и способностью к комплексообразованию.

Возможность косвенного флуориметрического определения макроциклических производных гликолурила – кукурбит[7]урила и куркурбит[8]урила продемонстрирована Кукурбит[*n*]урилы специфично влияют в работах [72; 73; 74; 75]. на интенсивность флуоресценции органических красителей: профлавина, пиронина, оксонина, Конго красного, метиленового синего и др.. Так, при взаимодействии с макроциклическими соединениями на основе гликолурила, изменяется интенсивность флуоресценции, например, при различных рН интенсивность флуоресценции акридинового красного при добавлении кукурбит[7]урила закономерно увеличивается. Изменение интенсивности флуоресценции при различных соотношениях акридинового красного и кукурбит[7]урила в смеси при значениях pH = 5.5и pH = 11,0 представлено на Рисунке 1.4.



Мольное соотношение кукурбит[7]урила и акридинового красного

Рис. 1.4 – Изменение интенсивности флуоресценции при различных соотношениях акридинового красного и кукурбит[7]урила в смеси при значениях pH = 5,5 и 11,0

Подобный косвенный метод флуориметрического определения предложен для подтверждения образования комплекса кукурбит[*n*]урилов с камфотецином [76]. Поскольку изменение интенсивности флуоресценции камфотецина при добавлении эквимолярного количества кукурбит[8]урила линейно снижается с ростом концентрации добавленного кукурбит[8]урила до достижения точки, при которой мольное соотношение реагентов составляет 1:1, авторы работы предполагают образование комплекса «гость-хозяин» в мольном соотношении кукурбит[8]урила и камфотецина 1:1.

На различиях спектров испускания комплексов состава кукурбит[7]урил-пальмитин и свободного пальмитина основан метод флуориметрического количественного определения цетилпиридиния в крови и моче с пределом количественного определения 7 мкг/л [77]: алкалоид пальмитин «вытесняется» цетилпиридинием из комплекса «гость-хозяин», при этом на спектре флуоресценции появляется новый максимум эмиссии, соответствующий свободному пальмитину. За счет высокой селективности метода флуориметрии и высокого сродства компонентов комплексов «гость-хозяин», достигается высокая специфичность метода: определению цетилпиридиния не мешают компоненты плазмы крови, анионные ПАВ, аминокислоты, катионы металлов, многие лекарственные средства и др.

Методом флуориметрического титрования исследован контролируемый переход при разных значениях pH ротоксаноподобного комплекса кукурбит[6]урила с диаминобутаном в различные формы, отличающиеся положением макроциклического кольца относительно диаминобутанового фрагмента молекулы. Схема перехода приведена на Рисунке 1.5 [78, 79]. Авторами установлено, что при увеличении pH уменьшается интенсивность флуоресценции, при этом при значении pH = 8,1 флуоресценция комплекса полностью исчезает, что свидетельствует о количественном переходе комплекса в нефлуоресцирующее состояние.



Рис. 1.5 – Зависимость флуоресценции комплекса «гость-хозяин» от относительного положения кукурбит[6]урилового фрагмента в структуре

Описанные эффекты флуоресценции таких соединений может быть использованы для селективного количественного определения комплексов «гость-хозяин» на основе кукурбит[*n*]урилов.

Необходимо отметить, что метод флуориметрии – наиболее специфичный метод прямого определения производных гликолурила, содержащих в структуре сопряженные ароматические фрагменты, обладающие способностью к флуоресценции. Ключевыми достоинствами метода являются высокая чувствительность (минимальный предел обнаружения составляет около 10⁻¹⁷ г), доступность оборудования, быстрота анализа и недеструктивность в отношении определяемых веществ.

Главными недостатками данного метода являются невозможность получить аналитический сигнал для нефлуоресцирующих соединений, строгая требовательность к процедуре пробоподготовки (на аналитический сигнал влияют примеси в растворителях), а также недостаточная «гибкость» метода: длина волны испускания является индивидуальной характеристикой вещества и не может быть изменена. Таким образом, при нахождении в пробе двух родственных соединений с близкими значениями длин волн испускания, достижение селективности анализа без использования предварительного разделения компонентов пробы крайне затруднительно.

ЯМР-спектроскопия является одним из наиболее широко используемым методом в анализе производных гликолурила. Исследование ЯМР-спектров гликолурилов позволяет точно выявить пространственные конфигурации симметрии молекул, при наличии которой атомы водорода и углерода бициклического каркаса проявляются эквивалентными сигналами. Также по химическим сдвигам ядер ¹Н и ¹³С в ЯМР-спектрах *N*-замещенных гликолурилов возможно идентифицировать тип заместителя: электроноакцепторные по экранированию атомов углерода карбонильных группы, и электронодонорные – по дезэкранированию метиновых протонов СН–СН-фрагмента молекулы, что обусловлено перераспределением электронной плотности и возникновением локальных парамагнитных вкладов вследствие анизотропии.

В работе [80] проведен анализ химических сдвигов в спектрах ¹Н и ¹³С ЯМР гликолурила и его производных (библиотека из 86 соединений) с целью выявления влияния донорноакцепторного характера заместителей на изменения электронной плотности в бициклическом каркасе с позиции симметрии и асимметрии. Диапазон изменений химических сдвигов ключевых атомов в ряду гликолурилов составляет: протонов – NH (7,49–9,96 ppm); CH–CH (5,14–6,63 ppm), углеродов C=O (151,40–161,79 ppm), CH–CH (61,55–74,86 ppm). Общий анализ ¹Н- и ¹³С-ЯМР-спектров изученных гликолурилов позволил авторам точно выявить пространственные конфигурации симметрии исследуемых молекул, при наличии

которой (σ^1 и/или σ^2), энантиотопные атомы водорода и углерода бициклического каркаса проявляются эквивалентными сигналами. Установлено, что по химическим сдвигам ¹H и ¹³C в ЯМР-спектрах *N*-замещенного гликолурильного каркаса можно четко различать гликолурилы с электроноакцепторными заместителями по экранированию атомов углерода C=O-групп, и электронодонорными заместителями по дезекранированию атомов углерода CH–CH-групп, что обусловлено перераспределением электронной плотности и возникновением локальных парамагнитных вкладов вследствие анизотропии.

В ходе общего анализа спектров ЯМР ¹Н и ¹³С изученных гликолурилов сделан вывод, что при любом типе N- или C-замещения наблюдается экранирование карбонильного атома С=О в имидазолидиноновом фрагменте молекулы. Проведенные обобщения позволяют четко различить симметричные и несимметричные молекулы, отличать сигналы примесей, которые зачастую могут сопровождать синтез гликолурилов и соединений на их основе. По спектрам ¹³С-ЯМР 1 H-И четко различить гликолурилы можно с электроноакцепторными *N*-заместителями по экранированию сигналов атома углерода карбонильных групп, и с электронодонорными *N*-заместителями по дезэкранированию атомов углерода метиновых групп.

В другой обзорной работе [81] проведен совокупный системный анализ химических сдвигов в спектрах ЯМР ³¹Р и ¹³С 89 фосфорсодержащих карбамидсодержащих гетероциклических соединений, которые отличаются валентным состоянием атома фосфора, размером цикла и способом сочленения циклов. Сопоставительное рассмотрение химических фосфорсодержащих сдвигов атома фосфора В карбамидсодержащих гетероциклах с пятикоординированным фосфором показал, что они преимущественно претерпевают отрицательный сдвиг, а их месторасположение в основном зависит от гибридного состояния Р в цикле и способом сочленения циклов. Попытка сопоставительного анализа химических сдвигов карбонильной группы –С=О в фосфорсодержащих карбамидсодержащих гетероциклах не позволила выявить существенных их различий из-за их изменений в узком интервале значений (151–156 ppm) независимо от валентного состояния атома фосфора в цикле и способа сочленения циклов (например в спиросоединениях и бициклических соединениях). Интерес экранирование С=О-группы представляет некоторое В фосфорсодержащих лишь гетероциклах по сравнению с самой мочевиной (159,5 карбамидсодержащих ppm) и бициклической бисмочевиной октанового ряда – гликолурилом (161,9 ррт). Данный наблюдаемый эффект, по-видимому, определяется увеличением стерических напряжений (компрессии) в фосфорсодержащих карбамидсодержащих гетероциклах из-за ограничений в гибкости их скелета, и, как следствие этого – усилением порядка амидной связи. Информативность анализа ЯМР-спектров фосфорсодержащих карбамидсодержащих

гетероциклов в некоторой степени понижает отсутствие величин химических сдвигов NH-групп, но данное обстоятельство связано с тем, что практически все синтезированные и идентифицированные фосфазациклы, приведенные в работах, содержат заместители при атомах азота.

По-видимому, из-за низкого содержания природных изотопов ¹⁵N и ¹⁷O и высокой трудоемкости выполнения анализа, в литературе практически отсутствуют сведения о применении ЯМР на ядрах ¹⁷O для ряда гликолурилов, а для получения информации о положении химических сдвигов ¹⁵N гликолурила **1** и его производных чаще всего применяются 2D гетерокорреляции спектров ¹H–¹⁵N [82] и установления прямой константы связи ¹⁵N–¹H [83].

Таким образом, метод ЯМР-спектроскопии представляет собой серьезный инструмент для идентификации и подтверждения структуры производных гликолурила. Данный метод наиболее достоверный способ исследования строения замещенных гликолурилов: положения, количества и типа *N*-заместителей. Особым преимуществом ЯМР-спектроскопии является то, что метод позволяет с высокой точностью установить пространственную конфигурацию симметрии гликолурилов.

Ключевым недостатком ЯМР-спектроскопии как метода анализа производных гликолурила является его неселективность в отношении родственных соединений в том случае, когда в пробе вещества присутствуют в виде смеси. Кроме того, важным недостатком является высокая стоимость ЯМР-спектрометров и необходимость использования дейтерированных растворителей.

Рентгеноструктурный анализ. Геометрические особенности гликолурилов по существу определяют возможность синтеза и изучения на их основе супрамолекулярных соединений. В ходе таких исследований установлено, что гликолурилы выступают строительными блоками таких полициклических конденсированных систем как кукурбит[*n*]урилы [2; 9; 84] и бамбус[*n*]урилы [85; 86], обладающих рядом уникальных физико-химических свойств.

Исследование пространственного расположения молекул, определяемое межмолекулярным взаимодействием, поляризации связей в синтонах, зачастую дает исходную информацию об организации супрамолекул на их основе. Полученная информация о строении молекулярных ансамблей, извлекаемая из кристаллических структур синтонов, используется для суждений о строении жидкостей и растворов, молекулярных кластеров и других надмолекулярных структур.

С учетом вышесказанного, в работе [87] проведен анализ результатов рентгеноструктурных исследований гликолурила **1** и его производных (библиотека из 39 соединений) и выявлены структурные особенности этих соединений, а именно: влияния

заместителей и их типов на геометрию молекул, и формирования водородных связей в кристаллах, что в конечном итоге определяет способность гликолурилов к образованию комплексов, макро- и супрамолекул. Результат обобщения рентгеноструктурных исследований обширного ряда гликолурилов позволил определить центры формирования водородных связей и центры, участвующие в комплексообразовании, так как в этих случаях происходит удлинение именно тех длин связей, которые участвуют в межмолекулярном связывании.

Анализ структурных параметров *N*-алкилгликолурилов и металлических комплексов показал наличие конформационного подобия молекулярных каркасов изученных соединений. Показано, что *N*-алкилзамещенные гликолурилы являются потенциально полидентатными лигандами (за счет вклада в координацию четырех атомов азота и двух атомов кислорода) и могут выполнять как монодентатную, так и бидентатно-мостиковую функцию с *d*-металлами со связыванием через группы С=О мочевинных фрагментов в зависимости координациооного числа атома металла.

Для комплексообразования атомы кислорода и азота являются наиболее возможными координационными центрами в гликолурилах, однако координация через атомы азота, как правило, стерически затруднена из-за преимущественного его пирамидального строения, тем более, что данный центр имеет пониженную электронную плотность относительно кислорода.

Основные геометрические параметры бициклического каркаса для *N*-арилалкилгликолурилов схожи с параметрами *N*-алкилгликолурилов. При введении в гликолурильный каркас заместителя с сильным электроноакцепторным свойством увеличиваются длины связей амидного фрагмента С–N, что вызывает уменьшение характера двоесвязанности и увеличение характера двойной связи С=O. Данный факт может объясняться тем, что для этих соединений происходит более эффективная гибридизация карбонильных атомов углерода до sp^2 -состояния, а во фрагменте С–N – до состояния sp^3 .

При совокупном рассмотрении диэдральных углов изученных гликолурилов сделан вывод, что при любом типе замещения (*C*- или *N*-) в гликолурильном каркасе, изменяются значения диэдральных углов в сторону их уменьшения, т.е. говоря по другому – наблюдается эффект «схлопывания» аннелированных имиадазолидиноновых циклов. Однако если обратить внимание на C_1 – C_5 -замещенные гликолурилы, замечено, что прогрессирующее уменьшение диэдрального угла в этих молекулах происходит с увеличением размера гидрофобного заместителя соединения (H > CH₃ > Ph). Такая же закономерность наблюдается и в ряду соединений с наличием электроноакцепторной функциональной группы (H > NH₂ > C(O)OC₂H₅).

Проведенные работы по изучению структуры гликолурилов методом рентгеноструктурного анализа оказались полезными для исследователей, занимающихся конструированием новых молекул на основе гликолурила 1 с заранее заданными свойствами в синтезе биологически активных соединений, молекулярных клипс и супрамолекулярных систем.

Метод масс-спектрометрии также находит значительное место в исследовании производных гликолурила. Чаще всего применяют метод масс-спектрометрии «прямого ввода», когда смесь веществ вводят в источник ионизации масс-спектрометра без предварительного разделения хроматографическими методами. В работе [88] предложен метод масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-MS) *N*-алкилированных димеров гликолурила без их предварительного хроматографического разделения. На приведенном на Рисунке 1.6 масс-спектре наблюдается три сигнала молекулярных ионов смеси димеров гликолурила.



Рис. 1.6 – Масс-спектр смеси димеров гликолурила без предварительного разделения

Метод масс-спектрометрии с электронной ионизацией (EI-MS) широко применяется для подтверждения структуры низкомолекулярных производных гликолурила [89]. С использованием данного способа ионизации при проведении масс-спектрометрического исследования синтезированных образцов описаны масс-спектры большого числа *N*-алкилированных и *N*-ацилированных производных гликолурила. Однако, режим ионизации EI-MS используется в масс-спектрометрах, де-факто, несовместим с методом жидкостной EI-HPLC хроматографии: современные решения не обеспечивают чувствительность сопоставимую с режимами ионизации при атмосферном давлении (АРІ). Таким образом, указанный метод не может быть использован для исследования и анализа смесей нелетучих соединений, что свойственно для многих производных гликолурила.

Метод масс-спектрометрии высокого разрешения ESI-TOF-MS для исследования производных гликолурила описан в работах [90, 91]. Однако, масс-спектрометрия для подтверждения структуры олигомерных производных гликолурила использована без предварительного хроматографического разделения. Авторами работы показано, что для получения аналитического сигнала может быть применен метод ионизации «Negative», при этом наблюдается образование ряда аддуктов предположительного состава, например, $[M + Br]^-$, $[M + Cl]^-$, $[M + F]^-$, $[M + 1H - 3Na]^{-2}$.

Macc-спектрометрия прямого ввода в режиме ионизации «Positive» используется для идентификации мономерных гликолурилов, идентификации В частности, для *N*,*N*'-дибензилгликолурила [92], фосфорилированных гликолурила [93] производных *N*,*N*'-диацетилгликолурилов. В обоих случаях обнаружены молекулярные ионы И соответствующих гликолурилов состава [M + H]⁺, механизм фрагментации авторами не описан. Характерный вид масс-спектра представлен на Рисунке 1.7.



Рис. 1.7 – Пример масс-спектра производного гликолурила [93]

Метод масс-спектрометрии был использован для исследования состава и путей распада нитропроизводных гликолурила. В работе [94] показано, что динитрогликолурил при введении в ионный источник электронной ионизации дает на масс-спектре ряд ионов *m*/*z* = 232, 231, 215,

183, 142 и др. Ключевые пути ионизации связаны с разрывом связей С–N, N–H и потери OH-группы. Как показано в работе, ряд сигналов на масс-спектре может быть не связан с динитрогликолурилом, а его источником могут быть возможные примеси, образующиеся при синтезе гликолурила. В работе показано, что динитрогликолурил, меченный атомами ²D и ¹⁵N, подвергается аналогичной фрагментации без значительных различий по интенсивности фрагментарных ионов.

Для исследования состава и количественного определения производных гликолурила методом масс-спектрометрии в работе [95] предложен метод матрично-ассоциированной лазерной десорбции и ионизации (MALDI-MS). Метод основан на мягкой ионизации молекул под воздействием лазерного излучения в присутствии кислот или оснований. MALDI-MS позволяет проводить анализ супрамолекулярных производных гликолурила в матрицах сложного состава, например, биологических объектах, без предварительной пробоподготовки и разделения на компоненты. Кроме того, достоинствами метода являются высокая чувствительность метода (минимальный предел обнаружения около 10⁻¹⁵ г) и возможность анализа соединений с высокой молекулярной массой – до 150 кДа.

Широкому распространению метода жидкостной масс-спектрометрии в значительной мере препятствует высокая стоимость оборудования для проведения исследования, а также сложность метода и требовательность к чистоте образца и используемых реактивов и материалов.

Метод спектроскопии ядерного гамма-резонанса (Мёссбауэровская спектроскопия) ограниченно применяется для производных гликолурила, содержащих в структуре атомы железа: кукурбит[*n*]урилферроцены [96] и другие супрамолекулярные комплексы на основе гликолурила [97].

Спектроскопия корреляционного рассеяния (Рамановская спектроскопия) ограниченно используется в исследовании производных гликолурила, в частности, для контроля протекания реакций и изучения строения некоторых производных гликолурила – комплексов «гостьхозяин». В частности, в работах [98; 99; 100; 101] показано отличие сигналов на спектрах новых комплексов на основе гликолурила от спектров их компонентов. Поскольку, при использовании данного вида спектроскопии, спектр не поддается детальной расшифровке, его используют только для контроля протекания синтеза и последующей идентификации соединений по принципу «отпечатков пальцев».

EXAFS-спектроскопия – метод спектроскопии, основанный на расшифровке тонкой структуры спектров поглощения рентгеновских лучей. В работах [102; 103; 104] показаны примеры расшифровки трехмерной структуры комплексов кукурбит[*n*]урилов и соединений

металлов: Си (II), U (VI) и Еи (III). Пример визуализации EXAFS-спектров комплекса кукурбит[5]урила и Еи (III) представлен на Рисунке 1.8.



Рис. 1.8 – Пример визуализации EXAFS-спектров комплекса кукурбит[5]урила и Eu (III) [104]

Метод EXAFS-спектроскопии позволяет определять межатомные расстояния, координационные числа, валентные состояния атомов и другие параметры. Редкость использования данного метода в отношении производных гликолурила объясняется высокой стоимостью оборудования и невозможностью определять параметры спектров соединений, не содержащих в структуре элементы с молекулярной массой менее 20.

1.3 Электрохимические методы анализа

Электрохимические методы анализа гликолурилов представлены в очень редких случаях. Так, метод вольтамперометрии ограниченно применяют для прямого определения производных гликолурила, например для анализа комплексов «гость-хозяин» на основе кукурбит[7]урила и замещенных металлоценов: ферроценов и кобальтоценов [105; 106], благодаря электрохимической активности металлов в этих соединениях.

Известны примеры использования производных гликолурила в качестве модификаторов электродов. Для анализа холестерина в плазме крове и пищевых продуктах в работах [107; 108] применено модифицирование электрода фосфорилированным производным гликолурила, не обладающим собственной электрохимической активностью.

Возможность исследования макроциклических комплексов гликолурила с цинком, марганцем, кобальтом, никелем и кадмием методом полярографии с капающим ртутным электродом исследовали в работах [109; 110] – показана связь между аналитическим сигналом, концентрацией металла, кукурбит[*n*]урила и константы взаимодействия компонентов комплекса «гость-хозяин».

Электрохимические методы анализа редко используют для исследований и анализа производных гликолурила. Предположительно, этот феномен связан с его непосредственными физико-химическими свойствами: низкой растворимостью, высокой химической стабильностью.

1.4 Химические методы анализа

В настоящее время производные гликолурила достаточно редко анализируют с использованием «традиционных» химических методов анализа. В работе [111] исследование продуктов распада кукурбит[*n*]урилов проведено с использованием сочетания инструментальных физико-химических и химических методов анализа – качественных реакций. Выделение аммиака и образование карбоната натрия при кипячении производных гликолурила в 30% растворе натрия гидроксида подтверждено по окрашиванию индикаторной бумаги.

Согласно работе [112], количественное определение *N*-алкилированных производных гликолурила возможно проводить с использованием метода Къельдаля. Для количественного определения *N*-тетраметилгликолурила также могут быть применены методы цериметрического и иодометрического титрования [113]. Данные методы анализа носят неселективный характер и пригодны только для анализа массовой доли основного вещества при условии идентификации и анализа примесей другим методом, например, хроматографией.

1.5 Хроматографические методы анализа

Газовая хроматография (ГХ). Известно несколько примеров анализа производных гликолурила методом газовой хроматографии. Например, в работе [114] предложено проводить разделение полностью алкилированных производных гликолурила: *N*,*N*,*N*,*N*-тетраметилгликолурила, *N*,*N*,*N*,*N*-изопропилтриметилгликолурила, *N*,*N*,*N*,*N*-диметилдиэтилгликолурила и *N*,*N*,*N*,*N*-тетраэтилгликолурила с использованием насадочной хроматографической колонки

длиной 1 м, заполненной стационарной фазой G3 OV-17 (50 % дифенил-, 50 % диметилполисилоксан).

Предложена методика анализа содержания *N*-тетраметилгликолурила в биологических жидкостях после экстракции хлороформом [115]. Метод заключается в газохроматографчическом разделении *N*,*N*,*N*,*N*-тетраметилгликолурила от компонентов матрицы стальной с использованием колонки, насадочной заполненной хромосорбом-G, модифицированным 3% дифенил-диметилполисилоксана OV-17. Газ-носитель – азот, хроматографирование в изотермическом режиме – 240°С, скорость потока газа на выходе из колонки – 35 мл/мин. Объем инжекции раствора – 2 мкл.

Способ анализа *N*-тетраэтилгликолурила методом газовой хроматографии с использованием капиллярной хроматографической колонки предложен в работе [116]. Условия анализа: колонка стеклянная 0,26 мм × 25 м, неподвижная фаза Xe-60 (цианоэтил метилсилоксан), изотермический анализ, температура колонки 185°С, скорость потока газаносителя – 2 мл/мин; деление потока 1/20. Внутренний стандарт – *N*-диметил-*N*-диэтилгликолурил. При использовании данного метода, время удерживания *N*-тетраэтилгликолурила составляет 20 мин, *N*-диметил-*N*-диэтилгликолурила – 24 мин.

Хроматография в тонких слоях сорбента (TCX). Метод хроматографии для разделения и анализа производных гликолурила используют значительно реже, чем спектральные методы анализа. Чаще всего в работах по производным гликолурила авторы отмечают, что контроль протекания реакции проводят методом TCX [117; 118; 119; 120; 121; 122]. Однако, достаточно распространенным случаем является то, что в работах не указаны условия проведения хроматографического анализа, не приведены типовые хроматограммы и фотографии хроматографических пластин.

В работе [123] достаточно детально изучен гидролиз тетраацетилгликолурила под действием различных нуклеофильных реагентов при комнатной температуре и pH = 10 в водно-спиртовой среде. Предполагаемая схема гидролиза приведена на Рисунке 1.9.



Рис. 1.9 – Механизм гидролиза тетраацетилгликолурила 2

Авторы установили, что процесс гидролиза соединения 2 происходит ступенчато через образование ряда *N*-ацетилгликолурилов: триацетилпроизводного **6**; изомерных диацетилгликолурилов **4**, **5** и **7**; моноацетильного производного **8** и, в конечном итоге – гликолурила **1**. Тонкослойная хроматография гиролизата тетраацетилгликолурила **1** на кизельгуровых пластинах, элюент хлороформ – метанол – этилацетат (7:2:2) и последующее проявление гидроксиламином и хлорным железом позволил разделить и установить значения R_f для соединений **1**, **2**, **4**–**8**. Значения R_f продуктов гидролиза **2** приведены в Таблице 1.4

Таблица 1.4 – Значения *R*_f продуктов гидролиза 2

Соединение	1	2	4	5	6	7	8
R_{f}	0,04	0,84	0,68	0,35	0,76	0,61	0,21

Отдельные ацетилгликолурилы **5**, **6**, **8** охарактеризованы с привлечением данных ЯМРи масс-спектрометрии. Результаты работы выглядят сомнительными: достичь хроматографического разрешения двух веществ, элюирующихся с близкими значениями удерживания при $R_f > 0,6$ возможно только при $\Delta R_f \ge 0,2$, поэтому разделить, охарактеризовать и идентифицировать вещества **7** и **5** при данных значениях R_f вряд ли возможно. Дополнительно хроматографическое разделение *N*-ацетилгликолурилов может быть достигнуто с использованием силикагелевых пластин Силуфол УФ-254 и элюента этанол-бензол в объемном соотношении 1:4 [124].

Методом ТСХ контролируют подлинность и содержание посторонних примесей *N*-тетраметилгликолурила – действующего вещества препарата «Адаптол» (АО «Олайнфарм», Латвия) [125]. Подлинность других алкилированных производных гликолурила также контролируют методом ТСХ [126; 127]. Разделение проводят с использованием в качестве стационарной фазы пластин «Силуфол». Хроматографируют пластины нанесенными пробами восходящим способом смесью растворителей ацетон-гексан в объемном соотношении 5:2. Проявляют пластины выдерживанием в иодной камере в течение 1–2 мин. В этих условиях найдено, что R_f диметилдиэтилгликолурила – 0,41, а R_f тетраэтилгликолурила – 0,49.

Подобные хроматографические условия для анализа *N*-диметил-*N*-диэтилгликолурила и его примеси – *N*-монометил-*N*-диэтилгликолурила предложены в работе [112]: стационарная фаза «Силуфол», подвижная фаза – смесь хлороформа и метанола в объемном соотношении 8:1. Проявление осуществляют опрыскиванием 10% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты с последующим нагреванием пластины до температуры 140°С. При использовании данной хроматографической системы, значение R_f диметилдиэтилгликолурила составляет 0,55, а R_f монометилдиэтилгликолурила – 0,37.

В подавляющем большинстве случаев, TCX-разделение производных гликолурила реализуется с использованием нормально-фазового режима на силикагеле. В работе [128] исследованы составы подвижных фаз для тонкослойной хроматографии, при использовании которых обеспечивается разделение *N*-тетраметилгликолурила (мебикара) от ряда лекарственных средств с близкой фармакологической активностью: хлорпротиксена, имипразина, клозапина и др.

В работе [129] нормально-фазовый режим ТСХ использован для разделения и дальнейшего препаративного выделения «молекулярных зажимов» на основе гликолурила –

ароматических производных гликолурила сложного состава. В качестве стационарной фазы авторы предлагают использовать силикагель, в качестве подвижной фазы – смеси метанола, этилацетата и хлороформа в различных соотношениях до достижения оптимального удерживания в зависимости от типа силикагеля. Практически аналогичные условия проведения хроматографирования *C*-замещенных производных гликолурила предложены в работах [130; 131]: стационарная фаза – немодифицированный силикагель с размером частиц 63–20 мкм, подвижная фаза – хлороформ-этилацетат (8:2) об. На приведенной фотографии на Рисунке 1.10 видно, что при использовании подобного метода не достигается полного разделения смеси. Похожие условия предложены авторами работы [132] для контроля протекания реакции *N*-тетраметилолгликолурила с ариламинами. В качестве стационарной фазы использовали TCX-пластины на основе сигикагеля-*G* Sofbfil-254; подвижная фаза – бензол-этанол (8:2).



Рис. 1.10 – Фотография ТСХ-пластины после разделения С-метилкукурбитурилов [131]

В работах [133; 134] авторами использован универсальный метод контроля производных *N*-тетраметилолгликолурила методом хроматографии в тонких слоях сорбента с использованием подвижной фазы состава хлороформ-метанол (9:1) об. на алюминиевых пластинах с нанесенным силикагелем-G Силуфол-254 производства ЧССР.

В работе [135] описан метод идентификации и анализа *N*-тетраметилгликолурила в плазме крови методом тонкослойной хроматографии в открытой ненасыщенной испарительной камере. Стационарная фаза – силикагель-G производства Сорбфил, подвижная фаза – ацетон. *Хроматография на бумаге* в настоящее время редко применяется для разделения низкомолекулярных веществ вследствие высокой трудоемкости. В работе [136] описан способ хроматографического разделения незамещенного гликолурила и его родственных веществ, таких как аллантоин, гидантоин и гидантоиновая кислота. Подвижная фаза, при которой достигается максимальное разделение компонентов: *н*-бутанол – уксусная кислота – вода в объемном соотношении 100:22:5. После разделения бумагу высушивают, опрыскивают 0,25% спиртовым раствором ацетата ртути (II), повторно высушивают, опрыскивают 0,05% раствором дифенилкарбазона в этаноле и нагревают до температуры 90°С. Утверждается, что гликолурил и его родственные соединения образуют на бумаге светло-голубые пятна.

Метод колоночной хроматографии для разделения и анализа производных гликоулрила используется реже, чем метод хроматографии в тонких слоях сорбента. Пример разделения методом жидкостной хроматографии низкого давления смеси производных гликолурила представлен в работе [137]: Так, *С,С'*-дифенил-*N,N'*-дибензилгликолурил, исходные и побочные продукты синтеза разделены и выделены методом нормально-фазовой хроматографии с использованием в качестве стационарной фазы сферического силикагеля с размером частиц 50 мкм, и смеси хлороформ-метанол (50:1) об./об. в качестве подвижной фазы.

В работе [138] исследован состав продуктов реакции между формальдегидом и гликолурилом методом обращенно-фазовой хроматографии со спектрометрическим детектированием в УФ-области. Наилучшее разделение пиков гликолурила и продуктов его взаимодействия с формальдегидом достигнуто с использованием стационарной фазы Hypersil MOS 5 мкм 200 × 4,6 мм и водой в качестве подвижной фазы. Однако, по результатам проведенного авторами исследования установлено, что существуют различные продукты реакции гликолурила и формальдегида. Вещества не были идентифицированы, кроме того, не было достигнуто полного хроматографического разделения компонентов смеси: разрешение между пиками не превышает значение $R_{\rm S} = 1,2$ даже при значении времени удерживания наиболее удерживаемого компонента $t_{\rm R} = 34,3$ мин.

В работе [139] чистоту и выход карбоксилированных производных гликолурила оценивали методов ОФ-ВЭЖХ с использованием стационарной фазы Kromasil C_{18} (сферический эндкепированный октадецилсилилированный пористый силикагель). Подвижная фаза – смесь воды с метанолом (6:4) об., элюирование изократическое. Оптическую чистоту производных гликолурила оценивали методом хиральной хроматографии с использованием стационарной фазы Astec Chirobiotic T на основе макроциклического гликопептидного антибиотика тейкопланина, привитого на силикагель. Подобный подход к разделению энантиомеров производных гликолурила также описан в работах [140, 141]: в качестве

стационарных фаз для анализа оптической чистоты авторы используют похожие сорбенты – силикагели, модифицированные агликоном тейкопланина (Astec Chirobiotic TAG).

Диастереомеры макроциклических ароматических производных гликолурила – ксилолбамбусурилов разделяли с помощью препаративной обращенно-фазовой градиентной флеш-хроматографии на сорбенте Grace C18 с использованием в качестве подвижной фазы смеси воды и ацетонитрила в объемном соотношении от 80:20 до 0:100 [142]. Установлено, что целевые диастереомеры разделяются частично и элюируются из картриджа за 27–30 мин.

Количественное определение *N*-тетраметилгликолурила (мебикара) в составе лекарственных препаратов – в таблетках, гранулах и капсулах, согласно источнику [143] проводят методом ВЭЖХ, однако условия анализа авторами не раскрываются. Кроме того, некоторые фирмы-производители *N*-тетраметилгликолурила декларируют, что массовая доля основного вещества в их продукции контролируется методом ВЭЖХ [144], при этом методики анализа отсутствуют в открытом доступе.

В работах [128; 145] показана возможность хроматографического определения *N*-тетраметилгликолурила методом микроколоночной ВЭЖХ с использованием хроматографической колонки, заполненной обращенно-фазовым сферическим адсорбентом ProntoSil 120-5-C18 Aq (Knauer). Подвижная фаза A – 200мМ раствор лития перхлората, доведенный 5мМ раствором хлорной кислоты до значения pH = 2,8; подвижная фаза 2 – ацетонитрил. Режим элюирования – линейный градиент от 5 % до 70 % ацетонитрила. Время удерживание *N*-тетраметилгликолурила около 7 минут, полное время анализа составляет 40 минут.

В работах [146, 147] методом флеш-хроматографии выделяли из реакционной массы ароматические производные гликолурила – (1,6-бис(*p*-метоксибензил)-7,8-ди-*p*-толилгликолурил, 1,6-дибензилгликолурил). В качестве стационарной фазы использовали сухие немодифицированные силикагели, в качестве подвижной фазы – смеси этилацетата с *н*-гексаном с содержанием этилацетата от 30 % до 50 %, и метанола с хлористым метиленом в объемном соотношении 1:10.

Методы ионообменной и лигандообменной хроматографии ограниченно применяют для выделения производных гликолурила. Например, в работе [148] методом лигандообменной препаративной хроматографии из реакционной массы выделены натриевые комплексы олигомеров (декамеров) гликолурила.

Эксклюзионную хроматографию используют для анализа молекулярной массы полимеров на основе гликолурила. Режим *GPC (Gel permeation chromatography)* применяют для определения молекулярной массы нерастворимых в воде полимеров на основе гликолурила

[149,]. Стационарная фаза в данном режиме – пористый сверхсшитый полимер на основе полистирола; подвижная фаза – чаще всего, хлороформ или диметилформамид.

Молекулярную массу водорастворимых полимеров на основе гликолурила анализируют чаще всего с использованием режима эксклюзионной хроматографии *SEC* (*Size exclusion chromatography*). Например, водорастворимые полимеры на основе гликолурила, эпихлоргидрина и формальдегида исследовали методом *SEC* в работе [150; 151].

Опубликована работа, в которой метод ВЭЖХ использован для подтверждения гипотезы об образовании супрамолекулярного комплекса гость-хозяин, пример хроматограммы приведен на Рисунке 1.11 [152]. Как предполагают авторы, при добавлении к липофильным соединениям кукурбит[*n*]урилов соответствующего размера, наблюдается уменьшение времени удерживания соединения в обращенно-фазовом режиме. Анализ проведен в следующих условиях: колонка – Agilent XDB-C18 (4.6 мм × 150 мм, 5 мкм), элюирование – градиент вода \rightarrow ацетонитрил в соотношении от 95:5 до 5:95 за 18 мин, скорость потока 1 мл/мин. Подвижная фаза подкислена 0,1% трифторуксусной кислоты для подавления вторичных взаимодействий в колонке.



Рис. 1.11 – Хроматограмма исходного соединения (синяя кривая) и его комплекса «гость-хозяин» с кукурбит[7]урилом (красная кривая) [152]

Методом препаративной хроматографии с использованием стационарной фазы C18 предложено выделять из реакционной массы замещенные макроциклические производные гликолурилов [153], но условия разделения и хроматограммы авторы в работе не приводят.

N-Диглицидиловые производные гликолурила, используемые в качестве сшивающих агентов для получения полимерных материалов высокой чистоты очищают от родственных примесей методом препаративной хроматографии. В качестве сорбента используют немодифицированный силикагель; элюент – смесь хлороформа и метанола 10:1 об. [154]

В работах [155; 156] авторы указывают, что анализ гликолурилов проведен методом ВЭЖХ, но условия анализа и хроматограммы в тексте работы не приведены.

Таким образом, хроматографические методы являются наиболее перспективными и информативными для анализа гликолурила **1** и его родственных соединений, так как позволяют осуществлять быстрое разделение сложных смесей органических веществ одновременно с количественным определением. Кроме того, хроматографическое разделение может быть адаптировано для препаративного выделения индивидуальных производных гликолурила в чистом виде, а также для сочетания с другими методами анализа: УФ- и массспектроскопией, флуориметрией, электрохимическими методами анализа и др.

Однако, методы разделения и анализа, основанные на хроматографии, в отношении производных гликолурила применяются ограниченно: например, в открытой литературе не показана даже принципиальная возможность анализа гликолурила методом хроматографии. В большинстве работ хроматографический анализ производных гликолурила сводится к определению его супрамолекулярных соединений типа «гость-хозяин», при этом чистота исходных соединений не контролируется. Но, поскольку содержание родственных соединений гликолурила при синтезе на его основе супрамолекулярных соединений нежелательно вследствие возможного образования макромолекул, отличных по свойствам от заданных, – необходим контроль чистоты низкомолекулярных производных гликолурила, особенно в отношении специфических примесей – пространственных изомеров.

Таким образом, наиболее специфичным и перспективным методом анализа гликолурила и его производных является жидкостная хроматография. Метод совместим с большинством других методов анализа, а разработанные методики, чаще всего, имеют большой потенциал для оптимизации и модернизации со временем.

Макроциклические производные гликолурила широко исследуются хроматографическими методами, однако методики анализа гликолурила, его примесей, *N*-метил и *N*-метилолпроизводных отсутствуют в открытой научной литературе.

2 Обсуждение результатов

2.1 Методология разработки хроматографического разделения производных гликолурила

Разработка условия детектирования. В связи с тем, что использование бо́льшей части детекторов, применяемых в жидкостной хроматографии, в отношении гликолурила и его близкородственных соединений, приведенных в Приложении А, сопряжено с рядом трудностей, в настоящей работе предложено использовать спектрофотометрическое детектирование в УФ-области для количественного анализа (концентрационный детектор) и масс-спектрометрическое детектирование для идентификации и подтверждения структуры веществ (характеристический детектор).

Как показано на Рисунке 2.1, гликолурил и его родственные примеси, а также его *N*-метил- и *N*-метилолпроизводные не содержат в структуре сопряженных ароматических систем, обеспечивающих поглощение УФ-излучения с длиной волны более 210 нм. Это обстоятельство служит основанием для использования длины волны детектирования 200 нм.



Рис. 2.1 – УФ-спектр раствора гликолурила 0,1 % в воде

Масс-спектрометрическое детектирование гликолурила позволяет увеличить специфичность разделения на начальном этапе разработки, а также идентифицировать

и охарактеризовать обнаруженные вещества. Недостатками масс-спектрометрического детектирования являются высокая стоимость оборудования, особые требования к чистоте используемых материалов, ВЭЖХ-колонок и несовместимость метода с рядом широко используемых приемов достижения ВЭЖХ-разделения полярных веществ: добавлением ионпарных модификаторов и высоким содержанием нелетучих компонентов в составе подвижной фазы и др.

Разработка хроматографического разделения. Для прогнозирования, разработки и оптимизации ВЭЖХ-разделения предложено использовать существующие «идеализованные» модели хроматографического разделения – теорию равновесной хроматографии Мартина-Синджа [157] и модель Снайдера [158]. В предельном виде, оптимальное разделение нескольких веществ на хроматограмме должно характеризоваться двумя параметрами: минимальным временем хроматографирования и полным разделением всех пиков до базовой линии. Полнота разделения пиков на хроматограмме связана с фактором разрешения $R_{\rm S}$, который вычисляют по формуле (1), согласно модели теоретических тарелок:

$$R_{\rm S} = \frac{t_{\rm R_2} - t_{\rm R_1}}{W_{\rm B}},\tag{1}$$

где $R_{\rm s}$ – фактор разрешения двух последовательно расположенных пиков;

*t*_{R_i} – время удерживания пиков на хроматограмме, мин;

*W*_в – среднее значение ширины пика у основания, мин.

Поскольку форма хроматографического пика практически соответствует нормальному распределению [157], две ближайших хроматографических зоны считаются полностью разделенными, если расстояние между вершинами пиков больше или равно полутора значениям ширины пиков: $t_{R_2} - t_{R_1} \ge 1,5 \cdot W_B$. В данном случае два вещества разделены более чем на 99,7 %, а относительная площадь их перекрывания на хроматограмме составляет около 0,3 %. Таким образом, предельно возможное разделение двух пиков – такое, при котором все определяемые вещества на хроматограмме последовательно разделены друг от друга с фактором $R_S \ge 1,5$.

Связь разрешения двух близкостоящих пиков от ключевых хроматографических параметров выражается уравнением Снайдера (2) [159]:

$$R_{\rm s} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{k_2'}{k_2' + 1} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha}, \qquad (2)$$

где *R*_s – фактор разрешения двух последовательно расположенных пиков; *N* – эффективность хроматографического пика; *k*[']₂ – коэффициент удерживания второго пика, численно равный относительному времени удерживания пика за вычетом «мертвого» времени колонки, в пересчете на «мертвое» время;

α – хроматографическая селективность разделения, численно равная отношению
коэффициентов удерживания двух последовательно расположенных пиков.

Из данного выражения следует, что достижение наилучшего разделения *n* веществ за минимальное время возможно различными способами в зависимости от существующих ограничений. В первую очередь, разрешение в жидкостной хроматографии ограничено фактической предельной эффективностью хроматографической системы, связанной с качеством набивки хроматографической колонки, диаметром и формой частиц стационарной фазы, длиной колонки, скоростью массопереноса и максимально реализуемым обратным давлением в системе хроматографа.

Во-вторых, для уменьшения времени анализа, с увеличением удерживания, селективность хроматографической системы должна уменьшаться с ростом значения фактора удерживания. Для наглядной иллюстрации данного факта на Рисунках 2.2–2.3 приведены смоделированные идеализованные хроматограммы гипотетической смеси пяти веществ со следующими параметрами: $N = 2\ 000$; $k'_1 = 0.28$; $\alpha_{1/2} = \alpha_{2/3} = \alpha_{3/4} = \alpha_{4/5} = 2.5$ на Рисунке 2.2; $N = 2\ 000$; $k'_1 = 0.28$; $\alpha_{1/2} = 2.5$; $\alpha_{2/3} = 1.75$; $\alpha_{3/4} = 1.5$; $\alpha_{4/5} = 1.36$ на Рисунке 2.3.



Рис. 2.2 – Смоделированная хроматограмма пяти веществ; $\alpha = const$



Рис. 2.3 – Смоделированная хроматограмма пяти веществ; $\alpha \neq const$

Как видно из Рисунков 2.2–2.3, в случае постоянной селективности хроматографической системы в отношении разделяемых веществ, разрешение хроматографической системы увеличивается при увеличении фактора удерживания веществ, что приведет к значительному увеличению времени анализа с ростом числа разделяемых соединений. При использовании хроматографической системы с уменьшающейся с ростом удерживания селективностью, возможно достичь разрешения всех пиков компонентов разделяемой смеси, приближенного к идеальному. Изменение селективности при использовании обращенно-фазового режима, то есть целенаправленное изменение удерживания некоторых определяемых веществ можно достичь несколькими путями: использованием подвижных и стационарных фаз разного состава, применением градиентного элюирования и др. Разработка и оптимизация хроматографического разделения может считаться завершенной, если достигнуто достаточное хроматографическое разделение за минимально возможное время хроматографирования [160].

Разработка метода численной оценки специфичности ВЭЖХ-разделения гликолурилов. Селективность методики – это способность аналитической методики однозначно избирательно выделять целевые аналитические сигналы определяемых веществ в матрице пробы при наличии сигналов других близкородственных веществ, которые могут присутствовать в пробе [161]. Методика анализа количественного содержания *N*-метилпроизводных гликолурила в присутствии других *N*-метилпроизводных гликолурила должна обеспечивать независимость аналитического сигнала каждого *N*-метилпроизводного гликолурила.

В связи с тем, что аналитический сигнал вещества на хроматограмме чаще всего имеет характерную форму хроматографического пика, разделяющую способность хроматографической системы в отношении определяемых веществ оценивают с использованием величин параметра хроматографического разрешения $R_{\rm S}$ каждой пары последовательно элюирующихся хроматографических пиков на хроматограмме.
В опубликованной литературе отсутствуют готовые математические модели, позволяющие численно связать влияние экспериментально установленных произвольных значений хроматографического разрешения *R*_S пар пиков на относительные значения площади перекрывания аналитического сигнала. Для численной оценки перекрывания пиков проводили расчет следующим образом:

$$R_{\rm S} = \frac{t_{\rm R_2} - t_{\rm R_1}}{W_{\rm B}} = \frac{t_{\rm R_2} - t_{\rm R_1}}{4\sigma}, \ h_{\rm i} = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_{\rm i} - t_{\rm R})^2}{2\sigma^2}},$$
значит в точке пересечения пиков при условии

 $S_1 = S_2 = S > 0, \ \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma > 0, \ \text{верно равенство:} \ \frac{S_2}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_1 - t_{R_2})^2}{2\sigma_2^2}} \left/ \frac{S_1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_1 - t_{R_1})^2}{2\sigma_1^2}} = 1, \ \sigma_1 = 0.$

поэтому точка пересечения перекрывающихся пиков t_i расположена на оси t при (3):

$$t_{\rm i} = t_{\rm R} + R_{\rm S} 2\sigma, \qquad (3)$$

значит, в соответствии с интегральной функцией нормального распределения Ф (4):

$$\Phi\left(\frac{t_{\rm i} - t_{\rm R}}{\sigma}\right) = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left[\frac{t_{\rm i} - t_{\rm R}}{\sigma\sqrt{2}}\right]\right), \quad (4)$$

таким образом, относительная ошибка интегрирования по причине частичного перекрывания двух хроматографических пиков на хроматограмме δ_X будет сведена к неэлементарной функции «erf», и представляет собой отношение площади разделенной части пика S_{SEP} к площади перекрывания пиков S_{MIX} . Таким образом, степень перекрывания пиков на хроматограмме в процентах может быть вычислена по формуле (5):

$$\delta_{\rm X} = [1 - (S_{\rm SEP} / S_{\rm MIX})] \cdot 100\% = [1 - \operatorname{erf}(\sqrt{2}R_{\rm S})] \cdot 100\%, \qquad (5)$$

где S_{SEP} – площадь разделенной части пика, отн. ед. мин;

S_{MIX} – площадь перекрывающейся части пика, отн. ед. мин;

 $R_{\rm S}$ – разрешение пиков на хроматограмме;

erf(x) – интеграл вероятности (Функция Лапласа), вычисляемый по формуле (6):

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{0}^{x} e^{-x^{2}} dx$$
, (6)

где $x = \sqrt{2}R_{\rm s}$.

Неэлементарная интегральная функция erf(x) может быть с высокой точностью вычислена с использованием специализированных программ. Расчеты в работе проведены с использованием программного обеспечения *WolframAlpha* [162].

Разработка методологии оптимизации чувствительности. При использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, чувствительность метода в первую очередь зависит от соотношения уровня шума и величины аналитического сигнала [163]. Величина аналитического сигнала – площадь хроматографического пика, однако на практике при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, чувствительность хроматографической системы оценивают по соотношению высоты сигнала при наибольшей высоте хроматографического пика $h_{\rm R}$ и интенсивности флуктуационного шума на хроматографической системы в отношении близкородственных соединений, при увеличении времени удерживания $t_{\rm R}$ пика, его ширина у основания $W_{\rm B}$ увеличивается пропорционально времени удерживания:

$$N = 16 \frac{t_{\rm R}^2}{W_{\rm B}^2} \quad \rightarrow \quad W_{\rm B} = 4 \frac{t_{\rm R}}{\sqrt{N}} \,. \tag{7}$$

Ширина у основания пика на хроматограмме $W_{\rm B}$, представляет собой отрезок на оси *t* (ось времени удерживания), ограниченный пересечением прямой Y = 0 и двух тангенциальных касательных, проведенных к пику в точках перегиба, находящихся примерно на уровне $h_{\rm R} / h_{\rm infl} = 60,65$ % высоты пика (8):

$$h_{\rm i} = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_{\rm i}-t_{\rm R})^2}{2\sigma^2}} \rightarrow h_{\rm infl} = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\sigma^2}{2\sigma^2}} = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi e}} \rightarrow \frac{h_{\rm infl}}{h_{\rm R}} = \frac{\frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi e}}}{\frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}}} = \frac{1}{\sqrt{e}} \approx 0,6065.$$
(8)

Перпендикуляры, опущенные из точек перегиба, пересекают ось *t* на расстоянии 0,5 $W_{\rm B}$ и находятся от точки $t_{\rm R}$ на расстоянии $\sigma = 0,25W_{\rm B}$. Поскольку хроматографический пик имеет форму кривой нормального распределения [157], высоту пика $h_{\rm i}$ при $t_{\rm i} = t_{\rm R}$, то есть, $h_{\rm R}$ в максимуме интенсивности пика $t_{\rm R}$ из формулы нормального распределения при $\sigma = 0,25W_{\rm B}$ возможно вычислить как (9):

$$h_{\rm i} = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_{\rm i} - t_{\rm R})^2}{2\sigma^2}} \rightarrow h_{\rm R} = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}} \rightarrow h_{\rm R} = \frac{4S}{W_{\rm R}\sqrt{2\pi}} \rightarrow h_{\rm R} = \frac{S}{t_{\rm R}}\sqrt{\frac{N}{2\pi}}.$$
 (9)

При близких значениях концентраций *С* и площадей пиков *S* гликолурила и его *N*-метилпроизводных, а также при условии, что относительное поглощение определяемых веществ имеет близкие значения вследствие наличия в структуре одинаковых хромофорных групп ($\varepsilon \approx \text{const}$) и при выполнении закона Бугера-Ламберта-Бера [165] для спектрофотометрического детектора с постоянной конфигурацией ячейки (l = const) для низких концентраций определяемых растворов, зависимость высоты пика от концентрации каждого определяемого вещества в введенном растворе можно вычислить по формуле (10):

$$S = \varepsilon l C = k C; \quad h_{\rm R} = \frac{S}{t_{\rm R}} \sqrt{\frac{N}{2\pi}} \quad \rightarrow \quad h_{\rm R} = \frac{k C}{t_{\rm R}} \sqrt{\frac{N}{2\pi}} \quad \rightarrow \quad h_{\rm R} = \frac{k^* C \sqrt{N}}{t_{\rm R}}, \quad (10)$$

где $k^* = \varepsilon l / \sqrt{2\pi} = \text{const, отн.ед.} \cdot \text{см}^3 \cdot \text{мин}/\Gamma;$

*t*_R – время удерживания хроматографического пика, мин;

*h*_R – высотка хроматографического пика, отн. ед.;

C – концентрация введенного вещества в растворе, г/см³.

Чувствительность хроматографической системы по критерию «сигнал-шум» для метода ВЭЖХ оценивают как $S/N = 2 h_R / n$, где n – интенсивность высота шума базовой линии хроматографа. Для достоверной оценки количественного содержания вещества в определяемом растворе, значение S/N на уровне минимально определяемой концентрации должно быть не менее 20 [166], поэтому численно минимальная чувствительность может быть вычислена по формуле (11):

$$S/N = \frac{2k^* C\sqrt{N}}{n t_{\rm R}}.$$
 (11)

С использованием полученных уравнений, мы смоделировали идеализованные графические изображения хроматограмм с некоторыми различными значениями времени удерживания пика $t_{\rm R}$, при этом, как видно на Рисунке 2.4, на каждой хроматограмме площадь пика *S*, эффективность хроматографической системы *N*, и интенсивность шума *n* не изменяются. Модель графически наглядно иллюстрирует, что критерий чувствительности наиболее требовательно может быть оценен по пику, который элюируется последним.



Рис. 2.4 — Модельные хроматограммы одного вещества при разных значениях времени удерживания $t_{\rm R}$: $h_{\rm R} = f(t_{\rm R})$, $N = {\rm const}$, $C = {\rm const}$, $n = {\rm const}$

Таким образом, по результатам проведенных расчетов установлено, что для родственных соединений целесообразно достижение чувствительности хроматографической системы по веществу, которое элюируется из колонки последним. Данный подход гарантирует чувствительность методики в отношении родственных соединений, последовательно элюирующихся из колонки раньше вещества, по которому проводят оценку чувствительности методики.

2.2 Разработка методики анализа родственных примесей гликолурила

Выбор хроматографического режима и условий пробоподготовки гликолурилов. Из-за того, что гликолурил нерастворим в большинстве органических растворителей и практически нерастворим в воде при комнатной температуре, задача хроматографического определения его родственных соединений может быть решена с использованием ограниченного числа хроматографических режимов. Поскольку гликолурил необратимо адсорбируется на немодифицированном силикагеле, а его растворимость резко снижается при добавлении к его водным растворам органических растворителей, таких как метанол, ацетонитрил и др., использование нормально-фазовых и гидрофильных режимов хроматографии не представляется возможным.

Гликолурил, как и его возможные примеси не обладает выраженными кислотноосновными свойствами, поэтому ионообменные варианты хроматографии также не могут быть использованы для их хроматографического определения. Таким образом, для разработки условий разделения гликолурила и его близкородственных соединений предложено использовать обращенно-фазовый режим ВЭЖХ. Учитывая, что основным веществом, вносящим вклад в растворимость исследуемых образцов гликолурила, является сам гликолурил, его предельная растворимость в воде определяет общее количество образца, которое возможно ввести в хроматографическую колонку.

В качестве испытуемого раствора предложено использовать водный раствор гликолурила с концентрацией около 1,2 мг/мл (растворимость около 1,7 мг/мл): «запас» в концентрации предотвращает выпадение осадка гликолурила при проведении пробоподготовки и введении пробы в хроматограф. Поскольку растворимость гликолурила несколько увеличивается при нагревании, предложено его раствор готовить путем растворения навески в воде при нагревании и перемешивании – 30–40 мг гликолурила на 10 мл воды. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают в колбу 10 мл воды для предотвращения выпадения осадка и охлаждают раствор до комнатной температуры. Концентрированные растворы гликолурила склонны к пересыщению, осадок при стоянии не образуется. Доводят объем исходного раствора водой до метки. «Заложенная» концентрация гликолурила в полученном растворе составляет около 1,2–1,6 мг/мл.

Достижение и оптимизация разрешения. Хроматографическое определение примесей в растворе гликолурила осложняется рядом технических сложностей, одна из которых состоит об отсутствии информации о профиле примесей. Известно, что в гликолуриле может содержаться мочевина и гидантоин, однако информация о других примесей в литературе отсутствует.

Разработку хроматографического разделения исследуемого образца предложено вести методом «грубой силы». В соответствии с (11), разрешение пиков некоторых неизвестных веществ на хроматограмме будет возрастать при увеличении эффективности, селективности и удерживания хроматографической системы:

$$R_{\rm s} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{k_2'}{k_2' + 1} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \,. \tag{11}$$

Суть метода «грубой силы» заключается в специфике зависимости хроматографического разрешения от удерживания и возможности «плавно» регулировать удерживание и разрешение При с минимальными затратами времени. неизменных значениях селективности эффективности хроматографической колонки, множители уравнения, связанные И с соответствующими параметрами можно условно принять за некоторую константу Х. Таким образом, разрешение хроматографической системы можно упрощенно выразить как функцию от удерживания (12):

$$R_{\rm s} = X \cdot \frac{k'}{k'+1}.\tag{12}$$

Как видно из графика на Рисунке 2.5, вклад удерживания в разрешение R_S резко возрастает при плавном увеличении значения k', в диапазоне от 0 до 1.



Рис. 2.5 – График функции k' = f(k' / [k'+1]) =

При значении хроматографического удерживания до k' = 1,0, вклад удерживания в реализуемое разрешение составляет 0,5, то есть, хроматографическая система «реализует» половину своей разрешающей способности при условии, что потенциальная критическая пара пиков будет элюироваться с временем удерживания, превышающим «мертвое» время в два раза.

Поэтому, концепция метода «грубой силы» заключается в элюировании исследуемого раствора при использовании подвижной фазы с заведомо высоким значением элюирующей силы. Закономерно, хроматографические пики определяемых веществ будут удерживаться слабо. При последующем дискретном увеличении значения удерживания возможно достичь состояния, при котором наиболее удерживаемый хроматографический пик будет удерживаться настолько долго, сколько необходимо для разрешения критических групп наименее удерживаемых пиков.

Для разделения родственных примесей гликолурила «вслепую» в качестве модельного исследуемого объекта выбран образец технического гликолурила. Хроматографировали 20 мкл

его раствора с использованием наиболее «эффективной» колонки, совместимой с «классичесими» моделями жидкостных хроматографов: колонка размером 4,6 × 250 мм, заполненная сферическим сорбентом с диаметром частиц около 3 мкм. Обратное давление в системе при использовании в качестве элюента воды составляет около 27 МПа.

Так как гликолурил представляет собой полярной соединение (log*P* < – 2,5), при использовании обращенно-фазового режима ВЭЖХ необходимо в качестве стационарной фазы использовать сорбенты с липофильными привитыми группами – октадецилсилильный силикагель. Во избежание труднопрогнозируемых остаточных ионных взаимодействий азотсодержащих определяемых соединений на поверхности сорбента, предложено использовать эндкепированный силикагель типа Б высокой чистоты. Выбрана объемная скорость потока 0,8 мл/мин для снижения обратного давления в системе.

Последовательно инжектировали исследуемый раствор, после каждой инжекции снижали содержание ацетонитрила в подвижной фазе вплоть до 0 % (чистая вода). В этих условиях на хроматограмме на Рисунке 2.6 можно наблюдать пик гликолурила и пики, соответствующие неидентифицированным примесям.



Рис. 2.6 – Хроматограмма испытуемого раствора технического гликолурила

Таким образом, разработаны хроматографические условия, обеспечивающие хроматографическое разрешение гликолурила и его родственных соединений, позволяющее за минимальное время эффективно контролировать качественный и количественный состав гликолурила. Для идентификации примесей в гликолуриле использован метод жидкостной хроматомасс-спектрометрии. В условиях положительной ионизации установлены значения *m/z* ионов примесей. Масс-спектры примесей представлены на Рисунках 2.7–2.10. Результаты идентификации примесей изложены в Таблице 2.1.



Рис. 2.7 – Пример масс-спектра примеси А гликолурила с временем удерживания 4,0 мин



Рис. 2.8 – Пример масс-спектра примеси В гликолурила с временем удерживания 5,6 мин



Рис. 2.9 – Пример масс-спектра примеси С гликолурила с временем удерживания 6,0 мин



Рис. 2.10 – Пример масс-спектра примеси **D** гликолурила с временем удерживания 8,5 мин

Шифр примеси	<i>t</i> _R , мин	Значение <i>m/z</i>	Предполагаемый механизм ионизации	Предполагаемая структура примеси
A	4,0	158 175	$\left[\mathrm{M+H} ight]^{+}$ $\left[\mathrm{M+H}_{3}\mathrm{O} ight]^{+}$	O HN NH2 O H H H O
В	5,6	117	$[M+H_3O]^+$	
С	6,0	242	$\left[\mathrm{M}\mathrm{+}\mathrm{H} ight]^{+}$	HN OH
D	8,5	224 241	$[M+H]^+$ $[M+H_3O]^+$	

Таблица 2.1 – Результат идентификации обнаруженных примесей гликолурила

Все идентифицированные примеси являются родственными соединениями гликолурила и, предположительно, могут образовываться как при синтезе гликолурила (примеси **A–D**), так и при окислении гликолурила (примесь **A**) [167]. Структуры примесей **A** и **B** дополнительно подтверждены путем сопоставления времен удерживания с образцами аллантоина и гидантоина. С использованием разработанных условий анализа примесей исследованы пути распада гликолурила в щелочной среде [168], а также проводится контроль чистоты гликолурила при проведении очистки [169].

Оценка метрологических характеристик

Селективность методики оценивали по критерию хроматографического разрешения $R_{\rm S}$ каждой пары хроматографических пиков на хроматограмме раствора технического гликолурила, заведомо содержащего родственные примеси. Минимальное разрешение между пиком гидантоина и пиком примеси с временем удерживания около 6,0 мин составляет $R_{\rm S} = 3,2$.

Методика обеспечивает достаточный уровень селективности для оценки содержания родственный примесей в образцах гликолурила, хроматографические пики мешающих и определяемых веществ не накладываются друг на друга. Хроматографическая система специфична в отношении родственных примесей гликолурила.

Чувствительность методики показана на примере наиболее удерживаемой коммерчески доступной реальной примеси гликолурила – гидантоина. Приготовлена серия модельных растворов гидантоина. Путем последовательного хроматографирования растворов установлено, что минимально определяемая концентрация единичной примеси по уровню сигнал/шум на хроматограмме не превышает 0,14 % единичной примеси, что соответствует 34,8 нг единичной примеси в одном объеме инжектируемого раствора. Хроматограмма модельного раствора единичной примеси гликолурила (гидантоина) в концентрации 0,14 % представлена на Рисунке 2.11.



Рис. 2.11 – Хроматограмма модельного раствора примеси гликолурила (гидантоина) для оценки чувствительности методики

Для данного уровня концентрации соотношение сигнал-шум S/N > 100, поэтому параметр «сигнал-шум» не является определяющим в подтверждении чувствительности данной методики. Методика позволяет определять в образцах гликолурила примеси на уровне 0,14 % гликолурила, при том, наиболее относительно содержания что «жесткие» нормы по содержанию единичной идентифицированной примеси, предъявляемые, например, к фармацевтическим субстанциям, составляют не менее 0,20 % [170]. В подразделах «Линейность», «Прецизионность», что методика обеспечивает достаточные показатели линейности, точности и прецизионности в том числе и на уровне минимально определяемой концентрации 0,14 % относительно содержания гликолурила.

Линейность методики также подтверждена на примере примеси гидантоина. Модельные растворы для оценки линейности приготовлены следующим образом: 43,6 мг гидантоина помещали в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяли в 200 мл воды под действием ультразвука и доводили объем раствора до метки водой. Из поученного раствора приготовлена серия модельных растворов; приготовление растворов подробно описано в таблице 2.2.

Хроматографировали каждый полученный модельный раствор. Наложенные хроматограммы модельных растворов для проверки линейности представлены на Рисунке 2.12.



Рис. 2.12 – Хроматограммы модельных растворов примеси гликолурила (гидантоина) для оценки линейности методики

abs., mV

№ раствора	Объем аликвоты, мл	Объем колбы, мл	«Заложенная» концентрация <i>C</i> , мкг/мл	Площадь пика S, отн. ед. [.] мин.	Среднее значение площади пика S, отн. ед. • мин.
				25625	
1	1	50	1,74	27710	26877,3
				27297	
				59918	
2	5	100	4,36	59685	59966,7
				60397	
				125942	
3	5	50	8,72	125088	124901,0
				123673	
				247693	
4	5	25	17,44	245340	245638,0
				243881	
				615212	
5	5	10	43,60	606435	610658,7
				610329	
				1190295	
6	Без разб	авления	87,20	1209142	1203661,7
				1211548	

Таблица 2.2 – Приготовление модельных растворов примеси гликолурила (гидантоина) и данные, полученные при исследовании линейности методики анализа примесей

По полученным значениям методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $C = a \cdot S + b$, получены параметры линейной зависимости концентрации определяемого вещества и площади пика гидантоина. Полученные параметры аппроксимации зависимости концентрации и аналитического сигнала представлены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Вычисленные параметры аппроксимации зависимости концентрации раствора примеси от величины аналитического сигнала

Вид уравнения линейной зависимости	Угловой коэффициент <i>а,</i> мкг/ (мл · отн.ед. · мин)	Свободный член уравнения <i>b</i> , мкг/мл	Коэффициент детерминации <i>R</i> ²
$C = a \cdot S + b$	$7,24 \cdot 10^{-5}$	0,24	0,99995

На Рисунке 2.13 представлен график зависимости концентрации единичной примеси гликолурила (гидантоина) от площади ее пика. На графике обозначена прямая, построенная по уравнению линейной зависимости.



Рис. 2.13 – График зависимости концентрации единичной примеси гликолурила (гидантоина) от площади пика примеси и прямая, построенная по уравнению *C* = *a* · *S* + *b*

Таким образом, установлено, что методика анализа линейна в диапазоне от 0,0027 мг/мл до 0,21 мг/мл единичной родственной примеси гликолурила **1**.

Прецизионность методики оценивали путем хроматографирования модельных растворов примеси гликолурила – гидантоина в условиях внутрилабораторной прецизионности Результаты исследования прецизионности представлен в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Результаты хроматографирования модельных растворов примеси гликолурила (гидантоина), расчет параметров прецизионности методики

Модельный раствор		1	2	3	
«Заложенное» значение		1 74	17 44	97 20	
концентрации раствора	<i>С</i> , мкг/мл	1,74	17,44	87,20	
Площадь пика	<i>i</i> = 1	25625	247693	1190295	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	27710	245340	1209142	
отн. ед., день 1 <i>S</i> _i	<i>i</i> = 3	27297	243881	1211548	
	среднее	26877,3	245638,0	1203662,0	
Коэффициент вариации					
площади пика, %					
$CV_{\rm S,r} = \frac{100}{\overline{S}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(S_i - \overline{S}\right)^2}{n-1}}$		4,11	0,78	0,96	

Модельный раствор		1	2	3
Площадь пика	<i>i</i> = 1	26153	246498	1169201
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	26988	248185	1186702
отн. ед., день 2 <i>S</i> _i	<i>i</i> = 3	26633	247318	1188468
	среднее	26591,3	247333,7	1181457,0
Коэффициент вариации	-	1 58	0.34	0.90
площади пика <i>CV</i> _{S,r} , %		1,50	0,34	0,90
Площадь пика	<i>i</i> = 1	26453	244559	1185156
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	26962	240479	1180190
отн. ед., день 3 <i>S</i> _i	<i>i</i> = 3	28262	241598	1195041
	среднее	27225,7	242212,0	1186796,0
Коэффициент вариации площади пика $CV_{S,r}$, %		3,43	0,87	0,64
Площадь пика	<i>i</i> = 1	27704	243812	1232026
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	26399	246259	1245435
отн. ед., день 4 S _i	<i>i</i> = 3	26770	248972	1230834
	среднее	26957,7	246347,7	1236098,0
Коэффициент вариации площади пика <i>CV</i> _{S,r} , %		2,49	1,05	0,66
Площадь пика	<i>i</i> = 1	24635	251813	1233519
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	26457	247973	1201876
отн. ед., день 5 S _i	<i>i</i> = 3	24657	252863	1211763
	среднее	25249,7	250883,0	1215719,0
Коэффициент вариации площади пика <i>CV</i> _{S.r} , %		4,14	1,03	1,33
СКО прецизионности S	_{Rm} , %	2,96	1,27	1,84
Предел внутрилаборато	рной			
прецизионности при $P = 0,95$:			8,20	
$R_{\rm JI,m} = 2,77 \cdot S_{\rm Rm}, \%$				
Максимальные значения границ,				
внутри которых погреш	ность			
результата анализа нахо	одится с	$\pm 5,80$		
принятой вероятностью	P = 0,95:			
$\pm D = \pm 1,96 \cdot S_{\text{Rm}_{\text{max}}}, \%$				

Таким образом, установлено, что разработанная методика обеспечивает приемлемые показатели чувствительности (ПКО < 1,7 мкг/мл), специфичности. Методика линейна и прецизионна в диапазоне концентраций единичной примеси гликолурила в испытуемом растворе от 1,7 мкг/мл до 87,2 мкг/мл.

2.3 Разработка методик анализа гликолурила и его *N*-метилпроизводных

В отличие от незамещенного гликолурила 1, его *N*-метилпроизводные 2–6 растворимы во многих полярных органических растворителях, в том числе в воде. В связи с этим предложено исследовать возможность хроматографического разделения гликолурила и *N*-метилпроизводных гликолурила с использованием обращенно-фазового механизма удерживания ВЭЖХ.

Разработка хроматографического разделения гликолурила 1 и его *N*-метилпроизводных **2–6** проводилась с использованием образцов веществ, представленных в Таблице 2.5.

Шифр вещества	Название	Структурная формула
1	Гликолурил	
2	2-Метилгликолурил	
3	2,6-Диметилгликолурил	
4	2,4-Диметилгликолурил	
5	2,8-Диметилгликолурил	
6	2,4,6,8-Тетраметилгликолурил	

Таблица 2.5 – Модельные гликолурилы, использованные для разработки

Установлено, что в обращенно-фазовом режиме удерживание *N*-метилпроизводных гликолурила **2–6** увеличивается при увеличении числа CH_3 -групп в структуре молекулы. Тетраметилгликолурил **6** не элюируется из колонки при использовании в качестве подвижной фазы 1% раствора ацетонитрила в воде, в качестве стационарной фазы – сферического пористого силикагеля L1 PerfectSil Target ODS-3 HD с размером частиц 5 мкм (MZ-Analysentechnik GmbH). При добавлении 5% ацетонитрила в состав подвижной фазы, вещество **6** элюируется из колонки с величиной фактора удерживания около k' = 17-18, при этом в обращенно-фазовом режиме для вещества **1** обеспечивается недостаточное удерживание для разрешения критической группы пиков: k' = 0,2. Хроматограмма приведена на Рисунке 2.14.



Рис. 2.14 – Хроматограмма раствора смеси гликолурила 1 и тетраметилгликолурила 6

Так как в обращенно-фазовом режиме хроматографирования достичь достаточного хроматографического разделения слабоудерживаемых компонентов **1–2** при условии элюирования тетраметилгликолурила **6** невозможно, мы предположили, что полное хроматографическое разрешение и элюирование веществ **1–6** за некоторое небольшое время возможно при использовании градиентного режима элюирования – непрерывного последовательного увеличения элюирующей силы растворителя.

С целью проверки предположения, проведена его экспериментальная проверка. Для этого хроматографировали вещества **1–6** в следующих условиях: колонка размером 150 × 4,6 мм L100 Zorbax SB-Aq, с размером частиц сорбента 5 мкм (Agilent Technologies); подвижная фаза A – 5% раствор ацетонитрила в воде; подвижная фаза B – 25% раствор ацетонитрила в воде; профиль градиента: 0,0 мин – 0 % ПФ В, 1,5 мин – 100 % ПФ В; объемная скорость потока F = 1,5 мл/мин, температура термостата колонки 30°С; объем инжекции 5 мкл.

Как видно из Рисунка 2.15, вещества 3-6 элюируются из колонки за минимальное время, наблюдается достаточное удерживание веществ 1–2 время, однако, изомеры диметилгликолурила 3–4 разделяются не полностью ($R_{S_{3/4}} = 1,35$), составляя критическую пару пиков вследствие недостаточной селективности хроматографической системы: 1,09. Увеличения разрешения критической пары до значения $R_{\rm S} \ge 1,50$, $\alpha_{_{3/4}} =$ в соответствии с уравнением Снайдера (2), можно достичь при увеличении эффективности хроматографической системы в $(1,50/1,35)^2 \approx 1,25$ раз, то есть, например, при использовании хроматографической колонки длинной более $(150 \times 1, 25) \approx 188$ MM. Поскольку преднаполненные ВЭЖХ-колонки длиннее 150 мм чаще всего выпускаются только длиной 250 мм, то при использовании колонки 250 мм, хроматографическое разрешение критической пары пиков может увеличиться в наилучшем случае в $(250/150)^{1/2} \approx 1,29$ раз, то есть до значения $R_{S_{2/4}} \approx 1.7$. Однако при подобном подходе время анализа увеличится до уровня $t_{\text{max2}} = (250 / 150) \times ([250 / 150] \times t_{0_1} + t_{\text{max1}}) \approx 12$ мин., то есть, как минимум в три раза.

Попытка достичь приемлемого разрешения критической пары пиков 3-4 путем увеличения удерживания хроматографической системы также приведет к увеличению времени анализа по причине значительного увеличения удерживания пика вещества 6. Например, для достижения разрешения $R_{S_{3/4}} \ge 1,5$, необходимо увеличить удерживание пика 4. Тогда необходимое увеличение общего удерживания хроматографической системы можно вычислить, модифицировав уравнение Снайдера: $(k'_s / [k'_s + 1]) / (k'_f / [k'_f + 1]) \ge 1,5 / 1,35; k'_s$ – начальное значение фактора удерживания пика 4, $k'_{\rm f}$ – минимально рассчитанное значение фактора удерживания пика 4 при котором будет достигнуто разрешение $R_{S_{3/4}} \ge 1,5.$ При $k'_{\rm s} = (t_{\rm R} - t_0) / t_0 = (3,27 - 1,0) / 1,0 = 2,27, k'_{\rm f} \ge 3,38$. При этом время анализа увеличится в 3,38 / 2,27 \approx 1,5 раза, то есть до значения около 7 мин.

Таким образом, для алкил-модифицированной стационарной фазы типа Zorbax SB-Aq условия разделения практически не подлежат оптимизации без значительных потерь: при оптимизации разрешения с использованием подхода увеличения *N* за счет удлинения хроматографической колонки, или при общем увеличении удерживания хроматографической системы, минимальное разрешение может быть достигнуто за счет значительного увеличения времени анализа.



Рис. 2.15 – Хроматограмма раствора смеси гликолурила **1** и его производных **2–6**, полученная с использованием стационарной фазы Zorbax SB-Aq

Для оптимизации разрешения мы использовании подход тонкой регулировки селективности – варьирование селективности хроматографической системы путем изменения качественного состава стационарной или подвижной фазы. При этом очевидно, регулирование селективности хроматографической системы что путем изменения качественного состава растворителя в отношении веществ 1-6 практически невозможно, так как удерживание и разделение незамещенного гликолурила 1 и *N*-метилгликолурила 2 осуществляется, фактически, в начальном изократическом участке градиента. На данном участке хроматограммы доминирующий компонент в составе подвижной фазы – вода. В связи с тем, что другие растворители в обращенно-фазовом режиме резко уменьшают удерживание компонентов, изменения селективности хроматографической системы нельзя достичь, изменяя состав подвижной фазы, но можно достичь при использовании стационарных фаз с другим химическим составом привитого селектора.

Сделано предположение, что селективность в отношении структурных изомеров диметилгликолурила **3–4** возможно увеличить при использовании стационарной фазы с привитыми «плоскими» полярными фрагментами; для подобных стационарных фаз характерна специфичность в отношении структурных изомеров – *«shape selectivity»*. Кроме того, реализация уменьшения селективности хроматографической системы с ростом коэффициента удерживания в обращенно-фазовом механизме хроматографии, реализующемся за счет дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий возможна при сочетании градиентного элюирования (линейного увеличения элюирующей силы подвижной фазы) и использовании стационарной фазы, содержащей в качестве линкера привитого слоя короткоцепочечный фрагмент. Предположительно, все эти требования могут выполняться при использовании

галогенированных фенил-алкил-силилированных силикагелей например, диметил(3-(пентафторфенил)пропил)силильного силикагеля («F5», «PFP» и др.) [171; 172].

При использовании подобных стационарных фаз реализуется сложный механизм удерживания за счет сочетания гидрофобных взаимодействий метильных и метиновыхгрупп гликолурилов, диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей и стерической селективности по форме за счет «плоских» привитых селекторов [173; 174; 175]. Предположительная природа взаимодействий гликолурилов на примере диметилгликолурила **5** и пентафторфенильной стационарной фазы PFP(2) проиллюстрирована на Рисунке 2.16.



Рис. 2.16 – Упрощенная предполагаемая схема множественных межмолекулярных взаимодействий между *N*-метилпроизводными гликолурила (на примере
2,8-диметилгликолурила 5) и стационарной фазой с «плоским» селектором PFP(2)

Для проверки возможности полного разделения метилгликолурилов 2–6 использовали преднаполненную колонку размером 150 × 4,6 мм, заполненную сферическим эндкепированным пентафторфенилпропилсилильным силикагелем L43 – Luna 5u PFP(2) 100 Å с размером частиц 5 мкм (Phenomenex). Хроматографические условия: подвижная фаза A – 5% раствор ацетонитрила в воде; подвижная фаза B – 25% раствор ацетонитрила в воде; профиль градиента: 0,0 мин – 0 % ПФ В, 1,5 мин – 25 % ПФ В; объемная скорость потока F = 1,5 мл/мин, температура термостата колонки 30°С; объем инжекции 5 мкл.

При использовании данной стационарной фазы в режиме градиентного элюирования достигнуто полное хроматографическое разделение веществ **1–6** менее чем за 4 мин с минимальным разрешением $R_{\rm S} = 1,6$ [176].

На Рисунке 2.17 приведена хроматограмма модельной смеси веществ **1–6** в оптимизированных условиях, в Таблице 2.6 представлены ключевые хроматографические параметры разделения.



Рис. 2.17 – Хроматограмма раствора смеси гликолурила **1** и его *N*-метилпроизводных **2–6**, в оптимизированных условиях с использованием стационарной фазы Luna PFP(2) 5u

	TC		<u> </u>		1	
$130\pi \mu \mu 376 -$. K TIMUADLIA TANA	MOTHLI N92	naporauuou	VNOMATOENA	MULECKON	CUCTEMLI
1 ao min a 2.0			paoorannon	Appmatorpa	WHITCORDE	CHUICMDI
1				1 1		

Веще- ство	Эффективность хро- матографической колонки N	Время удержи- вания t _R , мин	Фактор удержи- вания k'	Селективность с предыдущим пиком а	Разрешение с предыдущим пиком R _S
1	1 960	1,44	0,41	_	_
2	2 483	1,83	0,79	1,93	2,7
3	3 251	2,12	1,08	1,37	2,9
4	4 817	5,54	1,43	1,32	1,6
5	7 245	3,17	2,11	1,48	4,3
6	9 473	3,65	2,58	1,22	3,2

Таким образом, разработаны хроматографические условия, обеспечивающие полное разделение гликолурила **1** и его *N*-метилированных производных **2–6**. Минимальное разрешение для пары веществ **2–3** составляет $R_{S_{min}} = 1,6$.

Для проведения анализа растворяли пробу в воде или 5% растворе ацетонитрила в воде. Оптимальная концентрация определяемого раствора составила около 1 мг/мл. Пробу инжектировали в хроматограф с использованием петлевого автодозатора. Чувствительность метода проверяли непосредственно во время проведения анализа путем хроматографирования контрольного раствора – тетраметилгликолурила **6**, разбавленного до уровня минимально определяемой концентрации. Объем инжекции подбирали таким образом, чтобы достичь оптимальной чувствительности, при этом не допуская «перегрузки» колонки. Оптимальный объем инжекции зависит от концентрации раствора и составляет 20 мкл.

Хроматографировали испытуемый раствор, на хроматограмме интегрировали целевые пики, идентифицированные по времени удерживания путем сравнения с временем удерживания *N*-метилпроизводных гликолурила, идентифицированных абсолютными методами (см. п. *«Идентификация N-диметилпроизводных гликолурила»*).

Вещества **1–6** по строению являются близкородственными веществами и имеют хромофорные группы одинакового строения, поэтому для их количественного определения в смеси предложен метод нескорректированной внутренней нормализации. Данный метод позволяет определять количественное содержание родственных веществ в смеси без использования стандартных образцов и предварительной калибровки.

Оценка метрологических характеристик

Селективность методики оценена по разрешению $R_{\rm S}$ каждой пары хроматографических пиков на хроматограмме модельного раствора *N*-метилпроизводных гликолурила. Результаты оценки селективности представлены в Таблице 2.7. По полученным численным равенствам получены значения относительной ошибки интегрирования пика вследствие перекрывания за счет неполного разрешения $\delta_{\rm X}$.

Критическая пара пиков	Разрешение $R_{\rm S} = \frac{t_{\rm R_2} - t_{\rm R_1}}{W_{\rm B}}$	Относительная ошибка интегрирования вслед- ствие перекрывания $\delta_x = [1 - erf(\sqrt{2}R_s)] \cdot 100, \%$
1/2	2,7	$6,7\cdot 10^{-6}$
2/3	2,9	$6,6 \cdot 10^{-7}$
3/4	1,6	0,13
4/5	4,3	$8.0\cdot10^{-16}$
5/6	3,2	$1,5 \cdot 10^{-8}$

Таблица 2.7 – Результаты оценки селективности по разделяющей способности хроматографической системы в отношении гликолурила **1** и его *N*-метилпроизводных **2–6**

Таким образом, установлено, что методика обеспечивает необходимый уровень селективности, аналитические сигналы определяемых веществ не накладываются и не оказывают значимого влияния друг на друга в процессе проведения анализа. Хроматографическая система специфична в отношении гликолурила и его *N*-метилпроизводных при возможном присутствии гликолурила **1** и его *N*-метилпроизводных **2–6** в пробе.

Оценка чувствительности проведена на примере *N*-тетраметилгликолурила **6**, поскольку данное вещество из всех представителей *N*-метилпроизводных **2–6** гликолурила элюируется из хроматографической колонки с наибольшим временем удерживания. Для оценки чувствительности методики, хроматографировали модельный раствор *N*-тетраметилгликолурила в концентрации 2,7 мкг/мл (нижний заложенный диапазон методики).

На полученных хроматограммах интегрировали пик N-тетраметилгликолурила **6** и определяли его высоту пика $h_{\rm R}$. Определяли интенсивность флуктуационного шума детектора при использовании дейтериевой лампы спектрофотометрического детектора на конец срока эксплуатации лампы — около 10 000 ч. непрерывной работы детектора. Вычисляли величину значения *S/N* для пика *N*-тетраметилгликолурила и минимально определяемую концентрацию *N*-тетраметилгликолурила. Результаты оценки чувствительности представлены в Таблице 2.8.

Хроматограмма модельного раствора *N*-тетраметилгликолурила **6** с концентрацией 0,27 мкг/мл приведена на Рисунке 2.18.

Таблица 2.8 – Результаты определения чувствительности методики анализа

<i>N</i> -метилпроизводных	гликолурила 2-6
----------------------------	-----------------

Величина, характеризующая	Принятое предельное	Результат
чувствительность методики	значение	1 09 <i>311</i> 2141
Площадь пика S на уровне		104457
минимально определяемой	—	103576
концентрации, отн. ед. · мин.		104374
Среднее значение площади пика \overline{S}		
на уровне минимально определяемой	—	104136
концентрации, отн. ед. · мин.		
Высота пика <i>h</i> _R на уровне		12897
минимально определяемой	_	12667
концентрации, отн. ед.		12774
Среднее значение высоты пика		
$\overline{h}_{\mathrm{R}}$ на уровне минимально определя-	_	12782
емой концентрации, отн. ед.		
Интенсивность шума <i>n</i> , отн. ед.	I	102
Отношение сигнал-шум на уровне		
минимально определяемой	не менее 20	250
концентрации $S/N = 2 \overline{h}_{R} / n$	[1//]	
Минимально определяемая		
концентрация <i>N</i> -тетраметил-	—	2,7 · 10 ⁻⁶ г/см ³
гликолурила C_{\min} , г/л		



Рис. 2.18 – Хроматограмма модельного раствора, содержащего гликолурил в концентрации около 1,2 мкг/мл и *N*-тетраметилгликолурила в концентрации 2,7 мкг/мл

Как видно из Рисунка 2.18, на хроматограмме наблюдается интенсивный пик *N*-тетраметилгликолурила 6. Пик гликолурила 1 не мешает определению *N*-тетраметилгликолурила 6. На Рисунке 2.19 представлена увеличенная хроматограмма раствора, содержащего для имитации мешающего влияния матрицы гликолурил 1 в концентрации около 1,2 мкг/мл и *N*-тетраметилгликолурила в концентрации 2,7 мкг/мл. Пик с временем удерживания около 1,1 мин соответствует сигналу «мертвого времени», пик с временем удерживания около 1,5 мин соответствует незамещенному гликолурилу 1.



Рис. 2.19 – Увеличенная хроматограмма модельного раствора, содержащего гликолурил **1** в концентрации около 1,2 мкг/мл и *N*-тетраметилгликолурил **6** в концентрации 2,7 мкг/мл

Таким образом, установлено, что разработанная методика анализа *N*-метилпроизводных гликолурила обеспечивает чувствительность в отношении *N*-метилпроизводных гликолурила на уровне не выше 2,7 · 10⁻⁶ г/см³.

Для проверки линейности методики, приготовляли модельные растворы, содержащие незамещенный гликолурил **1** в постоянной концентрации и *N*-тетраметилгликолурил **6**. Растворы приготовлены путем параллельного разбавления исходного раствора растворителем, содержащим незамещенный гликолурил в соответствии с Таблицей 2.9. Исходный раствор приготовлен следующим образом: 134,0 мг *N*-тетраметилгликолурила помещали в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяли в растворителе при перемешивании и доводили объем колбы растворителем. Аликвоты исходного раствора помещали в мерные колбы, в соответствии с Таблицей 2.9, и доводили объемы растворов растворителем. Последовательно трижды хроматографировали каждый приготовленный модельный раствор. Наложенные хроматограммы модельных растворов для проверки линейности представлены на Рисунке 2.20.



Рис. 2.20 – Наложенные хроматограммы модельных растворов *N*-тетраметилгликолурила **6** для проверки линейности методики анализа

Таблица 2.9 – Приготовление модельных растворов *N*-тетраметилгликолурила **6** и экспериментальные данные, полученные при исследовании линейности методики

№ раствора	Аликвота, мл	Колба, мл	«Заложенная» концентрация <i>С</i> , мг/мл	Площадь пика S, отн. ед. [.] мин.	Среднее значение площади пика S, отн. ед. [.] мин.
				7934612	
1	20	25	0,2144	7925948	7876416
				7768688	
				5010069	
2	5	10	0,1340	5009237	5001898
				4986387	
				2028484	
3	5	25	0,0536	2033258	2031358
				2032331	
				512527	
4	5	100	0,0134	511273	512075,7
				512427	
				208015	
5	1	50	0,0054	205830	206692
				206231	
				104457	
6	1	100	0,0027	103576	104135,7
				104374	

Ha хроматограммах модельных растворов для подтверждения линейности интегрировали пик *N*-тетраметилгликолурила. Вычисляли среднее значение площади пика (данные приведены в Таблице 2.9). По полученным значениям методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $C = a \cdot S + b$, получены параметры линейной зависимости концентрации определяемого вещества на примере *N*-тетраметилгликолурила 6 и аналитического сигнала – площади пика. Полученные данные – в Таблице 2.10.

Таблица 2.10 – Вычисленные параметры аппроксимации зависимости концентрации определяемого вещества **6** и аналитического сигнала

Вид уравнения линейной зависимости	Угловой коэффициент <i>а,</i> мг/ (мл · отн.ед. · мин)	Свободный член уравнения <i>b</i> , мг/мл	Коэффициент детерминации <i>R</i> ²
$C = a \cdot S + b$	$3,72 \cdot 10^{-8}$	- 0,0007	0,9999

По полученному уравнению построен график зависимости концентрации *N*-тетраметилгликолурила **6** от интенсивности аналитического сигнала (площади пика); на графике на Рисунке 2.21 обозначена прямая линейной зависимости концентрации **6** от площади пика.



Рис. 2.21 – График зависимости концентрации *N*-тетраметилгликолурила **6** от аналитического сигнала (площади пика) и прямая, построенная по уравнению *C* = *a* · *S* + *b*

Таким образом, установлено, что методика анализа линейна в диапазоне от 0,0027 мг/мл до 0,21 мг/мл *N*-метилпроизводного гликолурила **6**.

Для проверки прецизионности методики в разные дни одним химиком аналитиком с использованием оборудования хроматографировали модельные одного растворы *N*-тетраметилгликолурила, приготовленные как указано в п. «Линейность». Прецизионность и методики показана на примере модельных растворов № 1, 3, 6 – на уровне принятых значений верхнего, нижнего предела определения методики и внутри диапазона. Результаты хроматографирования модельных растворов расчет параметров прецизионности И представлены в Таблице 2.11.

Таблица 2.11 – Результаты хроматографирования модельных растворов *N*-тетраметилгликолурила **6** и расчет параметров прецизионности методики

Модельный раствор		1	3	6	
«Заложенное» значение		0,2144	0,0536	0,0027	
концентрации раствора С, мг/мл					
Площадь пика	<i>i</i> = 1	7934612	2028484	104457	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	7925948	2033258	103576	
отн. ед., день 1 S _i	<i>i</i> = 3	7768688	2032331	104374	
	среднее	7876416	2031358	104135,7	
Коэффициент вариации		1,19	0,12	0,47	
площади пика, %					
Площадь пика	<i>i</i> = 1	7955721	2033297	104803	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	7952193	2035510	104966	
отн. ед., день 2 <i>S</i> _i	<i>i</i> = 3	8040347	2033390	104979	
	среднее	7982754	2034066	104916	
Коэффициент вариации		0,63	0,06	0,09	
площади пика <i>CV</i> _{S,r} , %					
Площадь пика	<i>i</i> = 1	8044657	2036400	104760	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	8042521	2033803	105098	
отн. ед., день 3 S _i	<i>i</i> = 3	7973766	2035391	104933	
	среднее	8020314	2035198	104930,3	
Коэффициент вариации		0.05	0.06	0.16	
площади пика CV _{S,r} , %		0,05	0,00	0,10	
СКО прецизионности S _{Rm} , %		1,08	0,11	0,45	
Максимальные значения границ,					
внутри которых погрешность		± 2,11			
результата анализа находится с					
принятой вероятностью $P = 0,95$					
$\pm D = \pm 1,96 \cdot S_{\rm Rm}, \%$					
Предел внутрилабораторной		2,99			
прецизионности при $P = 0,95$:					
$R_{\rm JI,m} = 2,77 \cdot S_{\rm Rm}, \%$					

Таким образом, установлено, что разработанная методика обеспечивает приемлемые показатели чувствительности (ПКО < 2,7 мкг/мл) и специфичности. Методика линейна и прецизионна в диапазоне концентраций гликолурила **1** и его *N*-метилпроизводных **2–6** в испытуемом растворе от 2,7 мкг/мл до 0,2 мг/мл.

Разработка методики препаративного хроматографического разделения изомеров N,N-диметилгликолурила

При синтезе дизамещенных *N*-метилгликолурилов **3–5**, только при синтезе изомера **4** возможно получить относительно чистый продукт [178]. При синтезе из *N*-метилмочевины и глиоксаля изомеров **3** или **5**, неизбежно образуется смесь обоих изомеров в примерном соотношении от 3:1 до 3:2. Схема синтеза приведена на Рисунке 2.22.



Рис. 2.22 – Схема синтеза *N*,*N*-диметилгликолурилов 3, 5

Для детального исследования свойств и последующей идентификации веществ **3** и **5** необходимо выделить их в чистом виде. В работах [140, 179, 180] показано, что разделение веществ **3** и **5** в чистом виде – длительный процесс, сопровождающийся низкими выходами (точный выход не указан). Поэтому, для получения изомерно чистых образцов **3** и **5** предложено разработать препаративный вариант хроматографической системы. Так как среди продуктов реакции, представленной на Рисунке 2.22 отсутствуют другие производные гликолурила, «базовое» ВЭЖХ-разделение (Рисунок 2.14) адаптировано для достижения наибольшей производительности в отношении разделяемых веществ **3** и **5**.

С использованием в качестве неподвижной фазы эндкепированного октадецилсилильного силикагеля Kromasil C18-5-100 в изократическом режиме элюирования

достигнуто разделение с наиболее приемлемым значением хроматографической селективности в отношении изомеров **3**, **5**: $\alpha_{3/5} \approx 1,9$. Наибольшее разрешение между пиками изомеров за минимальное время достигнуто при использовании в качестве подвижной фазы 7 %_{об.} раствора ацетонитрила в воде. Хроматограмма, полученная в препаративном режиме представлена на Рисунке 2.23.



Рис. 2.23 – Хроматограмма смеси изомеров *N*-диметилгликолурилов **3**, **5**, полученная в препаративных условиях

Таким образом, разработана хроматографическая методика препаративного получения изомерно чистых образцов диметилгликолурила [181], производительность хроматографической системы выделения изомеров составила около 3 г/ч для 3 и 2 г/ч для 5 [182]. Вещества 3 и 5 идентифицированы методами газовой хромато-масс-спектрометрии, жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии (см. далее). Выделенные в чистом виде *N*-метилпроизводные гликолурила **3**, **5** идентифицированы методами газовой хромато-масс-спектрометрии, жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и ¹Н-ЯМР-спектроскопии.

Жидкостная хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения. Методика ВЭЖХразделения гликолурила **1** и его *N*-метилпроизводных **2–6** воспроизведена на жидкостном хроматографе, оборудованном жидкостным хромато-масс-спектрометром высокого разрешения. По результатам исследования методом ВЭЖХ-МС установлено, что вещества **3** и **5** являются изомерами: на масс-спектрах обоих соединений присутствует сигнал со значением m/z = 171,0877, рассчитанная брутто-формула обоих соединений – C₆H₁₀N₄O₂.

ЯМР-спектроскопия. Для установления структуры соединений **3** и **5** получены одномерные ¹Н-ЯМР-спектры веществ в дейтерированном диметилсульфоксиде. Спектры представлены на Рисунках 2.24 и 2.25.



Рис. 2.24 – ¹Н-ЯМР-спектр выделенного образца *N*-диметилгликолурила **3**



Рис. 2.25 – ¹Н-ЯМР-спектр выделенного образца *N*-диметилгликолурила **5**

Как видно из приведенных ¹Н-ЯМР-спектров, синглетные сигналы со значениями химических сдвигов 2,61 ppm (3) и 2,78 ppm (5) соответствуют шести эквивалентным протонам двух CH₃-групп. Сигналы 7,57 ppm (3) и 7,40 ppm (5) соответствуют двум эквивалентным протонам незамещенных амидных групп. У вещества 3 в области 5,10 ppm присутствует сигнал эквивалентных метиновых протонов. Установлено, что 3 представляет собой двух 2,6-диметилгликолурил. На спектре вещества 5 в области 5,10-5,19 ррт наблюдается два дублетных сигнала, соответствующих двум неэквивалентным метиновым протонам мостикового фрагмента молекулы. Таким образом, вещество 5 представляет собой 2,4-диметилгликолурил.

Газовая хромато-масс-спектрометрия. По результатам исследования выделенных образцов методом ГХ-МС получены масс-спектры, представленные на Рисунке 2.26.



Рис. 2.26 – Структурные формулы и масс-спектры изомеров *N*-диметилгликолурилов 3–5

Как видно из масс-спектров, величины *m/z* фрагментарных ионов веществ **3** и **5** абсолютно совпадают, поэтому метод газовой хромато-масс-спектрометрии может быть использован только для идентификации изомера **4**. Мы предполагаем, что отсутствие видимых различий в фрагментации **3** и **5** связаны со сходством возможных путей фрагментации **3** и **5**, и отличием в предполагаемом механизме фрагментации вещества **4**, представленном на Рисунке 2.27.



Рис. 2.27 – Предполагаемая схема фрагментации молекул 3, 4, 5 при электронной ионизации

Как видно из предложенной схемы, вещества **3** и **5** при их электронной ионизации образуют ряд последовательно возникающих ион-радикалов со сходными значениями m/z. Напротив, вещество **4** при ионизации образует две последовательности ион-радикалов, при этом такой механизм исключает возможность образования ион-радикала с величиной m/z = 141. По наличию данного иона возможно судить о принадлежности конкретного *N*-диметилгликолурила к изомеру **4** или одному из изомеров **3** или **5**.

По результатам проведенных исследований, выделенные *N*-метилпроизводные гликолурила **3**, **5** идентифицированы, установлены их структурные формулы.

2.4 Разработка методики анализа N-метилолпроизводных гликолурила

Тетраметилолгликолурил и вещества, получаемые на его основе, широко используются для синтеза сверхсшитых полимеров специального назначения. Наиболее близкородственные примеси тетраметилолгликолурила, содержащие в своем составе, предположительно, меньшее число метилольных групп, могут оказывать значительное труднопрогнозируемое влияние на свойства получаемых высокотехнологичных полимерных продуктов, в связи с чем необходимо особо тщательно контролировать чистоту исходного тетраметилолгликолурила.

В работе [138] ранее было опубликовано исследование методом ВЭЖХ продуктов взаимодействия гликолурила 1 и формальдегида, однако авторам не удалось достигнуть удовлетворительных результатов. В частности, не достигнуто удовлетворительного хроматографического разделения продуктов взаимодействия: наилучшее достигнутое разрешение $R_{\rm S}$ составляет 1,19 за 34,3 мин, при этом не исследована природа пиков на хроматограмме. Как будет показано далее, данные условия непригодны для анализа и исследования состава продуктов реакции гликолурила 1 и формальдегида, поскольку компоненты пробы претерпевают ряд химических превращений даже непосредственно в хроматографической колонке за время анализа. Таким образом, необходимо разработать условия хроматографического разделения продуктов реакции гликолурила 1 и формальдегида и идентифицировать продукты реакции.

Разработка условий хроматографического разделения. Хроматографическое определение продуктов реакции формальдегида и гликолурила **1** – *N*-метилольных производных гликолурила необходимо для исследования процессов, протекающих при синтезе и деградации супрамолекулярных, полимерных и композиционных гликолурилсодержащих материалов. Поскольку продукты взаимодействия гликолурила с формальдегидом по пространственным свойствам могут являться близкородственными веществами *N*-метилгликолурилов с несколько меньшей липофильностью, мы адаптировали условия хроматографического разделения гликолурилов и их родственных соединений для *N*-метилольных производных.

Для разработки хроматографического разделения метилольных производных гликолурила, хроматографировали образец технического тетраметилолгликолурила, не соответствующего спецификации по показателю «содержанию связанного формальдегида», то есть, заведомо содержащий примеси три- и/или дизамещенных метилольных производных гликолурила. Образец растворяли в воде и хроматографировали с использованием стационарной фазы на основе октадецилсилильного силикагеля в качестве стационарной фазы 5 %-ного водного раствора ацетонитрила в качестве подвижной фазы. Путем и

последовательного снижения элюирующей силы за счет уменьшения доли ацетонитрила в составе подвижной фазы, достигнуто хроматографическое разделение; хроматограммы представлены на Рисунках 2.28, 2.29. Состав подвижной фазы в полученных условиях разделения методом ВЭЖХ – вода 100 %.



Рис. 2.28 – Хроматограмма образца коммерческого тетраметилолгликолурила



Рис. 2.29 – Увеличенная хроматограмма образца коммерческого тетраметилолгликолурила
На хроматограмме обнаружено несколько пиков: **P1–P4** – возможные продукты взаимодействия гликолурила **1** и формальдегида. Эффективность хроматографической системы составляет N = 21500 по последнему элюирующемуся пику на хроматограмме, минмальный коэффиент асимметрии $A_{\text{Smin}} = 0.9$, максимальный – $A_{\text{Smax}} = 1.0$.

При хроматографировании раствора мы установили, что с течением времени количественное соотношение компонентов раствора изменяется: увеличивается площадь хроматографических пиков с временами удерживания $t_{\rm R} = 6,0$ мин и $t_{\rm R} = 8,5$ мин, при этом уменьшается площадь пика с временем удерживания $t_{\rm R} = 11,4$. Сумма площадей пиков практически не изменяется с течением времени. На трех последовательно полученных хроматограммах, приведенных на Рисунке 2.30, невооруженным глазом заметно практически линейное изменение высот пиков.



Рис. 2.30 – Наложенные хроматограммы, полученные через каждые 20 мин, сдвинутые по оси *«time»* для наглядности: хроматограмма 1 – синяя кривая, хроматограмма 2 – красная кривая, хроматограмма 3 – зеленая кривая

Нами сделано предположение о том, что состав раствора изменяется со временем из-за гидролиза *N*-метилолгликолурилов и их взаимного превращения друг в друга с выделением в раствор некоторого количества свободного формальдегида. Для понимания природы происходящих явлений и, в дальнейшем – нивелирования изменений, происходящих в растворе тетраметилолгликолурила, проведен ряд дополнительных исследований.

Идентификация N-метилольных производных гликолурила

Для подтверждения структуры исходного тетраметилолгликолурила получен ¹Н-ЯМР-спектр образца, представленный на Рисунке 2.31. С целью предотвращения предполагаемого гидролиза образца, вещество растворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде.



Рис. 2.31 – ¹Н-ЯМР-спектр *N*-тетраметилолгликолурила **Р1**

Как полученного образец представляет собой видно ИЗ спектра, на спектре дополнительно *N*-тетраметилолгликолурил, однако присутствует сигнал, соответствующий протону амидной группы – 17 % мольн. в пересчете на предполагаемый *N*-триметилолгликолурил. Соответствие сигнала 5,47 ppm протону амидной группы подтверждено методом корреляционной ¹H/¹⁵N-*HMBC*-ЯМР-спектроскопии. Корреляционный спектр приведен на Рисунке 2.31.



Рис. 2.32 – ${}^{1}H/{}^{15}N$ -*HMBC*-ЯМР-спектр *N*-тетраметилолгликолурила **Р1**

Для установления структуры веществ, дающих пики на хроматограмме, представленной на Рисунке 2.29, хроматографическое разделение было адаптировано для ESI-масс-спектрометрического детектирования в режиме положительной ионизации. Получены хроматограммы по полному ионному току каждой наблюдаемого на УФ-хроматограмме хроматографической зоны. На Рисунках 2.33, 2.34 приведены фрагменты по полному ионному току хроматограммы в диапазоне от 5,7 мин до 7,0 мин.



Рис. 2.33 – УФ-хроматограмма и наложенный фрагмент МС-хроматограммы технического



N-тетраметилолгликолурила **Р1**

Рис. 2.34 – Увеличенный фрагмент МС-хроматограммы технического *N*-тетраметилолгликолурила **P1** в диапазоне времен удерживания 5,7–7,0 мин (**P3a**, **P3b**)

Как видно из приведенного фрагмента хроматограммы, в области 5,7–7,0 мин элюируется три хроматографических пика с временами удерживания $t_{\rm R} = 6,07$ мин, $t_{\rm R} = 6,21$ мин и $t_{\rm R} = 6,47$ мин. Получены масс-спектры всех обнаруженных на хроматограмме пиков; спектры представлены на Рисунках 2.35, 2.36, 2.37.



Рис. 2.35 – Масс-спектр пика с временами удерживания $t_{\rm R} = 6,07$ мин (**РЗа**)



Рис. 2.36 – Масс-спектр пика с временами удерживания $t_{\rm R} = 6,21$ мин (**РЗа'**)



Рис. 2.37 – Масс-спектр пика с временами удерживания $t_{\rm R} = 6,47$ мин (**P3b**)

Установлено, что вещества с временем удерживания $t_{\rm R} = 6,07$ мин и $t_{\rm R} = 6,21$ мин имеют одинаковые массы молекулярных ионов и фрагментарные массы и близкие значения относительной интенсивности сигналов ионов. Напротив, на масс-спектре пика с временем удерживания $t_{\rm R} = 6,47$ мин отсутствует сигнал иона с молекулярной массой m/z = 202.

По характеру фрагментации мы предполагаем, что вещества, которые элюируются в области времен удерживания 5,7–7,0 мин представляют собой *N*-диметилолгликолурилы **P3a**, **P3a', P3b**. Аналогичным способом идентифицированы вещества, элюирующиеся с временами удерживания $t_{\rm R} = 8,48$ мин. Результаты идентификации методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии и предполагаемые пути ионизации в источнике ESI *N*-метилолгликолурилов представлены в Таблице 2.12.

Таблица 2.12 – Иден	тификация	продуктов	реакции	гликолурила	1 V	формальдегида	— п	римесей
в <i>N</i> -тетраметилолглик	олуриле							

Шифр, время удержи- вания, мин	Обнаруженные сигналы <i>m/z</i> на масс-спектре	Предпо	элагаемый путь ионизации	Предполагаемая структура
	184	[X-H ₂ O+H] ⁺	$H_{N} \rightarrow H_{N} \rightarrow H_{N} \rightarrow H_{2} \rightarrow H_{2$	
РЗа, РЗа' 6,07 и 6,21	202	$[X+H]^+$	$HO_{N} = HO_{N} = H$	
	219	[X+H ₂ O+H] ⁺	$H_{H} + H_{2O} + H^{\dagger} + H_{2O} + H^{}$	0
P3b	184	[X-H ₂ O+H] ⁺	$H_{N} \rightarrow H_{N} \rightarrow H_{N} \rightarrow H_{2} \rightarrow H_{2$	ни он
6,47	219	[X+H ₂ O+H] ⁺	$HN \rightarrow OH + H_2O + H^{\dagger} \rightarrow HN \rightarrow OH + H_2O + H^{\dagger} \rightarrow HN \rightarrow OH + H_2O + H^{\dagger} \rightarrow HN \rightarrow OH + HN \rightarrow OH +$	HN N OH
	196	[Y-2H ₂ O+H] ⁺	$HN \rightarrow OH \rightarrow HI \rightarrow HI \rightarrow HI \rightarrow HI \rightarrow HI \rightarrow HI \rightarrow HI$	
P2 8,48	214	$[Y-H_2O+H]^+$	HO N NH HO HO NH HO NH HO NH HO NH HO HO NH HO HO NH HO HO HO HO HO HO HO H	
	249	$[Y+H_2O+H]^+$	HO N OH HO HO HO HO HO HO HO	

В связи с тем, что изменение пробы под действием воды в составе подвижной фазы и растворителя пробы значительно искажает результат анализа, нами было предложен ряд решений для преодоления данной проблемы.

Оптимизация хроматографического разделения N-метилолгликолурилов

Для уменьшения времени воздействия воды на компоненты пробы мы предложили уменьшить время хроматографического разделения до такой степени, что под действием подвижной фазы степень превращения компонентов пробы не давала значимого вклада в точность и прецизионность разрабатываемой методики анализа. Поскольку в обращеннофазовом режиме хроматографии пики *N*-метилолгликолурилов **P1–P4** элюируются последовательно в зависимости от числа метилольных групп в структуре молекул, а изомеры дизамещенных производных P2a-P2b практически идентичны по способности к адсорбции в обращенно-фазовом режиме хроматографии, – возможно определять групповое содержание *N*-метилольных производных гликолурила: тетра-, три и сумму дизамещенных производных. Поэтому возможность селективного определения всех компонентов может быть реализована за меньшее время хроматографирования.

Расчет параметров хроматографической колонки, необходимых для хроматографического разделения *N*-метилольных производных гликолурила представлен в Таблице 2.13.

	Знач	Формула расчета	
Параметр	Исходные данные Оптимизация		
Разрешение <i>R</i> _S между пиками Р1 и Р2	$R_{S} = 7,6$	$R_{\mathrm{S}_{\mathrm{Calc}}}=3,0$	$R_{\rm S} > 1,5$
Минимальная эффективность колонки N	21 500	3 350	$N_{2} = N_{1} \cdot \frac{R_{\rm S_{2}Calc}^{2}}{R_{\rm S_{1}}^{2}}$
Длина колонки L, мм	250	$L_{\rm Min} = 39$ $L_{\rm Real} = 100$	$L_2 > L_1 \cdot \frac{N_1}{N_2}$

Таблица 2.13 – Расчет параметров колонки для оптимизация времени хроматографирования *N*-метилолгликолурилов **P1–P4**

	Знач		
Параметр	Исходные данные	Оптимизация	Формула расчета
Диаметр колонки <i>d</i> _с , мм	4,6	2,1	_
Объемная скорость потока F, мл/мин	0,8	$F_{\rm Min} = 0,17$ $F_{\rm Real} = 0,34$	$F_2 > F_1 \cdot \frac{d_{C2}^2}{d_{C1}^2}$
Время удерживания после- днего пика <i>t</i> _{R max} , мин	11,4	$t_{\rm R_{Calc}}=2,17$	$t_{R_2} = t_{R_1} \cdot \frac{L_2 \cdot F_1 \cdot d_{C_2}^2}{L_1 \cdot F_2 \cdot d_{C_1}^2}$

Как видно из Таблицы 2.13, время анализа технически возможно сократить в 5 раз при использовании хроматографической колонки в 2,5 раза меньшей длины, и при увеличении линейной скорости потока в 2 раза. Для уменьшения задержки массопереноса вследствие повышения линейной скорости потока, мы использовали хроматографическую колонку 100 × 2,1 мм, заполненную поверхностно-пористым адсорбентом Agilent PoroShell EC-100 C18 с диаметром частиц 2,7 мкм. Объем инжекции для этой колонки уменьшен пропорционально уменьшению площади сечения колонки _ В 4 раза. В результате достигнуто хроматографическое разрешение, обеспечивающее разделение целевых веществ за 2 мин: $t_{\rm R_{max}}$ = 1,91 мин, при этом пики целевых веществ полностью разделяются: $R_{\rm S_{min}}$ = 2,8. Хроматограмма в разработанных условиях приведена на Рисунке 2.38.



Рис. 2.38 – Хроматограмма раствора технического *N*-тетраметилолгликолурила в оптимизированных условиях

Для предотвращения гидролиза исследуемых веществ, навеску пробы предложено растворять в безводном метаноле: метилольные производные гликолурила растворимы в спиртах, кроме того, метанол не обладает чрезмерно высокой элюирующей силой в обращенно-фазовом хроматографической режиме, поэтому инжектирование относительно небольшого объема метанольного раствора не приводит размыванию К пиков. При использовании подходов достигнуто хроматографическое данных разделение, обеспечивающее стабильность значений площадей пиков в течение, как минимум, 40 мин. Наложенные хроматограммы, полученные через 20 мин каждая приведены на Рисунке 2.39 (сдвиг по оси «time» для наглядности).



Рис. 2.39 – Наложенные хроматограммы, полученные в оптимизированных условиях через каждые 20 мин: хроматограмма 1 – синяя кривая, хроматограмма 2 – красная кривая, хроматограмма 3 – зеленая кривая

Таким образом, разработаны и оптимизированы условия быстрого хроматографического разделения и определения *N*-метилольных производных гликолурила: *N*-тетраметилолгликолурила **P1**, *N*-триметилолгликолурила **P2** и *N*-диметилолгликолурилов **P3**.

Оценка метрологических характеристик

Селективность методики подтверждена по значениям разрешения $R_{\rm S}$ пиков на хроматограмме. Методика селективна в отношении *N*-метилолпроизводных гликолурила: Минимальное хроматографическое разрешение $R_{\rm Smin}$ – разрешение между пиками *N*-триметилолгликолурила **P2** и *N*-тетраметилолгликолурила **P1** составляет 2,8.

Для оценки линейности приготовлен модельный раствор № 1: 56,8 мг образца *N*-тетраметилолгликолурила помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в метаноле под действием ультразвука и доводили объем раствора метанолом. Из полученного раствора приготовили ряд модельных растворов в соответствии с Таблицей 2.14. Последовательно хроматографировали приготовленные растворы. На хроматограммах, представленных на Рисунке 2.40, интегрировали пик *N*-тетраметилолгликолурила.



Рис. 2.40 – Хроматограммы модельных растворов *N*-тетраметилгликолурила **P1** для оценки линейности

Таблица 2.14 – Приготовление модельных растворов *N*-тетраметилгликолурила **P1** и экспериментальные данные, полученные при исследовании линейности методики

<u>N₀</u> nactrona	Аликвота,	Колба,	«Заложенная» концентрация <i>С</i> ,	Площадь пика S,	Среднее значение площади пика S,	
раствора	14131	14131	мг/мл	отн. ед. • мин.	отн. ед. • мин.	
	Pactbon	No. 1		64605		
1	Гаствор Ј	\≌ 1 ения	0,5680	64634	64704,7	
	осэ развед	сния		64875		
	Doorpon No 1.			51112		
2	racisop 1º 1. 20	25	0,4544	50688	50778,0	
	20			50534		
	Deemon Mal:			31658		
3	гаствор № 1. 5	10	0,2840	31989	31824,3	
	5			31826		
	Deemon Mal:			12639		
4	racibop № 1.	10	0,1136	12432	12538,7	
	2			12545		
	Doorpon No 2.			9830		
5	r ac i вор № 2. 2	10	0,0909	9732	9829,7	
	2			9927]	
	Deemon Me 1:			5812		
6	гаствор № 1. 1	10	0,0568	5821	5812,0	
	1			5803		
	Deemon Me 2:			3742		
7	гаствор № 2. 2	25	0,0364	3719	3742,0	
	2			3765		

Методом наименьших квадратов проведена аппроксимация зависимости аналитического сигнала от концентрации раствора. Данные представлены в Таблице 2.15.

Вид уравнения линейной зависимости	Угловой коэффициент <i>а,</i> мг/ (мл · отн.ед. · мин)	Свободный член уравнения <i>b</i> , мг/мл	Коэффициент детерминации <i>R</i> ²
$C = a \cdot S + b$	$3,76 \cdot 10^{-8}$	$4,85 \cdot 10^{-3}$	0,9985

Таблица 2.15 – Вычисленные параметры аппроксимации зависимости концентрации *N*-тетраметилолгликолурила **P1** и аналитического сигнала (площади пика на хроматограмме)

По полученному уравнению построен график зависимости концентрации *N*-тетраметилолгликолурила **P1** от площади хроматографического пика, на Рисунке 2.41 показана прямая линейной зависимости.



Рис. 2.41 – График зависимости концентрации *N*-тетраметилолгликолурила **P1** от аналитического сигнала (площади пика) и прямая, построенная по уравнению $C = a \cdot S + b$

Таким образом, установлено, что методика анализа линейна в диапазоне концентраций от 0,568 мг/мл до 0,036 мг/мл *N*-метилолпроизводного гликолурила **P1** в исследуемом растворе.

Оценка *чувствительности* проведена одновременно с оценкой линейности: хроматографировали модельный раствор, содержащий 36,4 мкг *N*-тетраметилолгликолурила **P1** в 1 мл метанола. Хроматограмма модельного раствора приведена на Рисунке 2.42.



Рис. 2.42 – Хроматограмма модельного раствора *N*-тетраметилолгликолурила **P1** для оценки чувствительности

На полученной хроматограмме интегрировали пик *N*-тетраметилолгликолурила **P1**. Определяли высоту пика и интенсивность флуктуационного шума на хроматограмме. Соотношение сигнал-шум на хроматограмме составило *S/N* = 1:14. Установлено, что минимально определяемая концентрация *N*-метилолпроизводного гликолурила составляет 36,4 мкг/мл.

Для проверки *прецизионности* методики хроматографировали модельные растворы *N*-тетраметилологликолурила **P1**, приготовленные как указано в п. «Линейность», № 1, 3, 7 в условиях внутрилабораторной прецизионности. Результаты хроматографирования модельных растворов, расчет параметров прецизионности – Таблица 2.16

Таблица	2.16	-	Результаты	хроматографирования	модельного	раствора
<i>N</i> -тетрамет	илолгли	колури	ла Р1 , расчет па	араметров прецизионности	методики	

Модельный раствор		1	3	7
«Заложенное» значение концен-		0 568	0.2840	0.0367
трации раствора С, мг/м	Л	0,500	0,2040	0,0307
Площадь пика	<i>i</i> = 1	3683	32009	65058
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	3787	32157	64429
отн. ед., день 1 S _i	<i>i</i> = 3	3837	31973	64679
	среднее	3769,0	32046,3	64722,0
Коэффициент вариации		2.08	0.20	0.40
площади пика, %		2,08	0,30	0,49

Модельный раствор		1	3	7	
Площадь пика	<i>i</i> = 1	3730	31351	64799	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	3654	32349	63761	
отн. ед., день 2 S _i	<i>i</i> = 3	3753	31743	64773	
	среднее	3712,3	31814,3	64444,3	
Коэффициент вариации площади пика <i>CV</i> _{S.r} , %		1,40	1,58	0,92	
Площадь пика	<i>i</i> = 1	3742	31658	64605	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	3719	31989	64634	
отн. ед., день 3 S _i	<i>i</i> = 3	3765	31826	64875	
	среднее	3742,0	31824,3	64704,7	
Коэффициент вариации площади пика $CV_{S,r}$, %		0,61	0,52	0,23	
Площадь пика	<i>i</i> = 1	3724	32202	65140	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	3731	31915	63898	
отн. ед., день 4 S _i	<i>i</i> = 3	3809	31518	63717	
	среднее	3754,7	31878,3	64251,7	
Коэффициент вариации площади пика $CV_{S,r}$, %		1,26	1,08	1,21	
Площадь пика	<i>i</i> = 1	3777	32487	64831	
на хроматограмме,	<i>i</i> = 2	3767	31703	65036	
отн. ед., день 5 <i>S</i> _i	<i>i</i> = 3	3719	31752	64638	
	среднее	3754,3	31980,7	64835,0	
Коэффициент вариации плошали пика <i>CV</i> s., %		0,83	1,38	0,31	
СКО прецизионности S _{Rm} , %		0,99	0,77	0,55	
Предел внутрилабораторной прецизионности при $P = 0.95$: $R_{\Pi,m}$ = 2.77 · S_{Bm} . %		2,74			

Разработанная методика обеспечивает приемлемые показатели чувствительности (ПКО менее 37 мкг/мл), специфичности. Методика линейна и прецизионна в диапазоне концентраций *N*-метилольного производного гликолурила (на примере **P1**) в испытуемом растворе от 36,7 мкг/мл до 0,57 мг/мл.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реактивы, материалы и оборудование

Реактивы

Образцы производных гликолурила синтезированы в Лаборатории органического синтеза ТГУ. Вода I степени чистоты получена с использованием системы очистки воды Simplicity-UV.

Ацетонитрил, for UV, IR, HPLC, ACS (PanReac AppliChem);

Метанол, for HPLC (J.T. Baker);

Метанол, for HPLC, GS, Spectrophotometry, (Honeywell B&J);

Дейтерированный диметилсульфоксид, >99 % D;

Гидантоин, 98 % (Sigma Aldrich).

Материалы

Колбы мерные 2 – 500 – 2, 2 – 250 – 2, 2 – 200 – 2, 2 – 100 – 2, 2 – 50 – 2, 2 – 25 – 2 и 2 – 10 – 2 по ГОСТ 1770-74, цилиндры мерные 1 – 250 – 2, 1 – 100 – 2 и 1 – 50 – 2 по ГОСТ 1770-74; пипетки 1а – 2 – 1, 1а – 2 – 2, 2 – 2 – 5 и 2 – 2 – 10 по ГОСТ 29169-91;

Одноканальный дозатор переменного объема ДПОП-1-5-50, (Ленпипет);

Одноканальный дозатор переменного объема, 100-1000 мкл, (LLG labware);

Флаконы пенициллиновые НС-3, ФО-10 мл;

Стакан В-1-50 ТС со шкалой по ГОСТ 25336-82;

Пипетка Пастера полиэтиленовая, 3 мл;

Пробирки центрифужные 1,5 мл (Eppendorf);

Виалы, объем 1,5 мл, с винтовой резьбой № 9, септа силиконовая (Agilent Technologies);

Шприцевые фильтры d = 20 мм, размер пор 0,45 мкм (Agilent Technologies);

Колонка Zorbax SB-Aq 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies);

Колонка Luna 5u PFP(2) $150 \times 4,6$ мм, 5 мкм (Phenomenex);

Колонка Poroshell 120 EC-C18, 150 × 2,1 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies);

Колонка ACE Excel-3 C18, 250 × 4,6 мм, 3 мкм (ACT);

Колонка HP-5MS 30 м \times 0,25 мм, 0,25 мкм (Agilent Technologies).

Оборудование

Ванна ультразвуковая Elmasonic P10H (Elma);

Система очистки воды Simplicity-UV (MerckMillipore);

Весы аналитические GR-200 (A&D);

Жидкостной хроматограф UltiMate 3000, оснащенный спектрофотометрическим детектором VWD-3400RS (Thermo Scientific);

Жидкостной хроматограф LC-20 Prominence, оснащенный спектрофотометрическим детектором SPD-20A (Shimadzu);

Macc-спектрометр Sciex API-2000 LC/MS/MS (Sciex);

Macc-спектрометр высокого разрешения 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies);

ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE 400 III HD (Bruker);

UV/Vis-спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu);

Газовый хромато-масс-спектрометр GCMS QP2020 (Shimadzu);

Центрифуга СМ-50 с герметичным ротором 50.01 (Eppendorf).

3.2 Методики анализа

Методика анализа гликолурила по показателю «Родственные примеси»

Анализ гликолурила по показателю «Родственные примеси» проводят методом ВЭЖХ.

Испытуемый раствор. В стеклянный стакан помещают около 60–70 мг образца гликолурила (точная навеска), добавляют 30 мл воды очищенной, нагревают при перемешивании до полного растворения навески. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл воды и охлаждают колбу с раствором до комнатной температуры. Доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.

Хроматографические условия. Колонка стальная 250 × 4,6 мм, заполненная сферическим эндкепированным октадецилсилильным силикагелем с диаметром частиц 3 мкм ACE Excel-3 C18. Температура термостата колонки 26°C. Подвижная фаза – вода. Объемная скорость потока 0,8 мл/мин. Детектор УФ-спектрофотометрический, длина волны 200 нм. Объем вводимой пробы 25 мкл. Время хроматографирования: не менее 2 времен удерживания пика гликолурила.

Ориентировочное время удерживания гликолурила – от 4 мин до 5 мин. Относительные нескорректированные времена удерживания *RRT* примесей в пересчете на гликолурил:

аллантоин – 0,89, гидантоин – 1,22, примесь 1 (гидантоиновый аддукт гликолурила) – 1,33, примесь 2 (бис-гидантоиновый аддукт гликолурила) – 1,87.

Порядок проведения анализа: перед началом анализа уравновешивают колонку подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, далее трижды хроматографируют испытуемый раствор.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику гликолурила не менее 7 000;

- фактор асимметрии пика гликолурила не менее 0,9 и не более 1,5.

На каждой хроматограмме интегрируют пик гликолурила и пики примесей, значения площадей которых превышают 0,2 % от площади пика гликолурила. Содержание каждой родственной примеси гликолурила в процентах (C_x) вычисляют по формуле:

$$C_{\rm X} = \frac{S_{\rm X}}{S_{\rm Gu} + \sum_{\rm i=1}^{\rm n} S_{\rm i}} \cdot 100$$

где $S_{\rm X}$ – среднее значение площади пика примеси, отн. ед.;

*S*_{Gu} – среднее значение площади пика гликолурила, отн. ед.;

*S*_i – среднее значение площадей пиков остальных примесей, отн. ед.

Методика идентификации примесей гликолурила методом ВЭЖХ-МС

Идентификацию родственных примесей гликолурила проводят методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Испытуемый раствор. Около 2 мг исследуемого образца растворяют в 10 мл метанола, фильтруют через шприцевой фильтр.

Условии анализа. Настройка хроматографа – как указано в разделе «Методика анализа гликолурила по показателю "Родственные примеси"». Настройка масс-спектрометра: источник ионизации TurboIon, электроспрей, полярность (+), напряжение на капилляре 5 кВ, температура источника ионизации 350°C, скорость потока газа-завесы 4 мл/мин, скорость потока газа в источнике ионизации 36 мл/мин. Сканирующий режим в диапазоне *m/z* 105–400. Частота детектирования 5 Гц. «Отсекают» пик гликолурила дивертером.

Соотносят сигналы на УФ-хроматограмме и МС-хроматограмме по полному ионному току. Для пиков примесей получают масс-спектры. Идентифицируют вещества по значениям *m/z* молекулярных ионов.

Методика идентификации N-метилпроизводных гликолурила методом ГХ-МС

Идентификацию *N*-метилпроизводных гликолурила проводят методом газовой хроматомасс-спектрометрии.

Испытуемый раствор. Около 2 мг исследуемого образца растворяют в 10 мл метанола, фильтруют через шприцевой фильтр.

Условия анализа. Колонка капиллярная 5% фенил-, 95% диметилполисилоксан (HP-5MS) 30,0 м × 0,25 мм, толщина пленки стационарной фазы 0,25 мкм. Температурный режим: 150,0°C – 1 мин; нагрев 10,0°C/мин до 290°C; 290°C – 17 мин. Время хроматографирования 17,0 мин. Температура испарителя 290,0°C. Газ-носитель гелий, скорость потока 1,44 мл/мин, деление потока 1:5. Объем вводимой пробы 0,5–1,0 мкл. Масс-спектрометрический детектор, электронная ионизация. Температура источника ионизации 200°C. Температура детектора 300°C. Напряжение на детекторе 0,2 кВ. Сканирующий режим в диапазоне m/z 68 – 328. Время детектирования: 1,6 – 17,0 мин.

Для наиболее интенсивного пика на хроматограмме по полному ионному току получают масс-спектр. Идентифицируют вещество по значениям *m/z* молекулярного и осколочных ионов.

Методика определения гликолурила и его N-метилпроизводных

Определение гликолурила и его *N*-метилпроизводных проводят методом ВЭЖХ. Для анализа гликолурила используют испытуемый раствор, приготовленный как указано в п. «Методика анализа гликолурила по показателю "Родственные примеси"».

Испытуемый раствор N-метилпроизводных гликолурила. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 20–30 мг образца N-метилпроизводного гликолурила (точная навеска), добавляют воду при перемешивании до полного растворения навески, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.

Хроматографические условия. Колонка стальная $150 \times 4,6$ мм, заполненная сферическим эндкепированным пентафторфенилпропилсилильным силикагелем с диаметром частиц 5 мкм Luna PFP(2) 5u. Температура термостата колонки 30°C. Подвижная фаза A - 5% раствор ацетонитрила в воде; подвижная фаза B - 25% раствор ацетонитрила в воде; профиль градиента: 0,0 мин – 0 % ПФ B, 1,5 мин – 100 % ПФ B; объемная скорость потока F = 1,5 мл/мин, температура термостата колонки 30°C; объем инжекции 5 мкл. Детектор УФ-спектрофотометрический, длина волны 200 нм. Время хроматографирования 4,5 мин.

Порядок проведения анализа: перед началом анализа уравновешивают колонку подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, далее хроматографируют подвижную фазу *B*, затем – трижды испытуемый раствор.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику тетраметилгликолурила не менее 2 000;

- фактор асимметрии пика тетраметилгликолурила не менее 0,9 и не более 1,5.

На каждой хроматограмме интегрируют пик гликолурила и пики *N*-метилпроизводных гликолурила. Содержание каждого компонента в смеси в процентах (*C*_x) вычисляют по формуле:

$$C_{\rm X} = \frac{S_{\rm X}}{\sum_{i=1}^{n} S_i} \cdot 100,$$

где $S_{\rm X}$ – среднее значение площади пика определяемого компонента, отн. ед.;

*S*_i – среднее значение площадей остальных пиков, отн. ед.

Методика хроматографического определения N-метилолгликолурилов

Определение хроматографической чистоты *N*-тетраметилолгликолурила проводят методом ВЭЖХ. Для анализа гликолурила используют испытуемый раствор, приготовленный как указано в п. «Методика анализа гликолурила по показателю "Родственные примеси"».

Испытуемый раствор N-метилпроизводных гликолурила. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 10 мг образца N-тетраметилолгликолурила, добавляют 8 мл метанола, перемешивают до полного растворения навески, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают. Фильтруют образец через шприцевой фильтр.

Примечание. Если образец не растворяются в метаноле, при приготовлении обрабатывают колбу с раствором ультразвуком в течение 5 мин. Если после обработки ультразвуком образец не растворился в метаноле, делают заключение о наличии в пробе нерастворимых в метаноле компонентов. Пробу можно проанализировать на содержание гликолурила, как указано в п. «Методика определения гликолурила и его *N*-метилпроизводных».

Хроматографические условия. Колонка стальная $100 \times 2,1$ мм, заполненная сферическим поверхностно-пористым эндкепированным октадецилсилильным силикагелем с диаметром частиц 2,7 мкм PoroShell EC-120 C18. Температура термостата колонки 26°C. Подвижная фаза – вода; объемная скорость потока F = 0,34 мл/мин; объем инжекции 5 мкл. Детектор

УФ-спектрофотометрический, длина волны 200 нм. Время хроматографирования не менее 1,5 времен удерживания пика *N*-тетраметилолгликолурила (около 3 мин).

Порядок проведения анализа: перед началом анализа уравновешивают колонку подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, далее хроматографируют подвижную фазу, затем – трижды испытуемый раствор.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику тетраметилгликолурила не менее 1 500;

- фактор асимметрии пика тетраметилгликолурила не менее 0,9 и не более 1,5.

На каждой хроматограмме интегрируют пик *N*-тетраметилолгликолурила ($t_{\rm R} \approx 2$ мин) и пики остальных *N*-метилольных производных гликолурила ($t_{\rm R} < 2$ мин). Содержание каждого *N*-метилольного производного гликолурила в смеси в процентах ($C_{\rm x}$) вычисляют по формуле:

$$C_{\rm X} = \frac{S_{\rm X}}{S_{\rm 4MGU} + \sum_{\rm i=1}^{\rm n} S_{\rm i}} \cdot 100,$$

где $S_{\rm X}$ – среднее значение площади пика определяемого *N*-метилолгликолурила, отн. ед.; $S_{\rm 4MGU}$ – среднее значение площади *N*-тетраметилолгликолурила, отн. ед. $S_{\rm i}$ – среднее значение площадей остальных пиков, отн. ед.

выводы

1. Разработана методика хроматографического разделения и определения ключевых родственных примесей гликолурила;

2. Обнаруженные примеси гликолурила идентифицированы методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии;

3. Разработан способ препаративного хроматографического разделения и выделения изомерно чистых *N*,*N*'-диметилгликолурилов – важнейших региоселективных синтонов для получения новых гетерофункциональных соединений.

4. Структура выделенных *N*,*N*'-диметилгликолурилов установлена методами хроматомасс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии;

5. Установлены оптимальные условия хроматографического разделения и определения гликолурила и его *N*-метилпроизводных;

6. Разработана методика экспрессного хроматографического определения *N*-метилольных производных гликолурила;

7. *N*-метилольные производные гликолурила идентифицированы методом хромато-массспектрометрии;

8. Оценены метрологические характеристики разработанных методик анализа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Α	Аллантоин
B	Гидантоин
С	2-(5-Гидрокси-2-оксоимидазолидин-4-ил)-2,4,6,8-
	тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
D	6H-2,3,4a,5,7,7б-Гексагидрогексаазабициклопента[a,c,d]пентален-
	1,4,6(2H,2a1H)-трион
1	2,4,6,8-Тетраазабицикло[3.3.0] октан-3,7-дион
2	2-Метил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
3	2,6-Диметил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
4	2,4-Диметил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
5	2,8-Диметил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
6	2,4,6,8-Тетраметил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
P1	2,4,6,8-Тетраметилол-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
P2	2,4,6-Триметилол-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
P3a	Смесь 2,6-триметилол-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-диона и
	2,4-триметилол-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-диона
P3b	2,8-Диметилол-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
P4	2-Детилол-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
ΠΦ	Подвижная фаза
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
TCX	Хроматография в тонких слоях сорбента
УΦ	Ультрафиолетовый
ИК	Инфракрасный
EI	Электронная ионизация
API	Ионизация при атмосферном давлении
ESI	Ионизация электроспреем
MALDI	Матрично-ассоциированная лазерная десорбция-ионизация
SEC	Эксклюзионная хроматография
GPC	Гель-проникающая хроматография
ЯМР	Ядерно-магнитный резонанс
PCA	Рентгено-структурный анализ
ПАВ	Поверхностно-активное вещество

95

ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

Структурные формулы исследованных в работе соединений

Шифр	Структурная формула	Название
Α		2,5-диоксо-4-имидазо- лидинил)мочевина
В		2,4-имидазолидиндион
С		2-(5-гидрокси-2- оксоимидазолидин-4-ил)- 2,4,6,8-тетра- азабицикло[3.3.0]октан-3,7- дион
D		6H-2,3,4a,5,7,7б- гексагидрогексаазабицикло- пента[a,c,d]пентален- 1,4,6(2H,2a1H)-трион
1		2,4,6,8- тетраазабицикло[3.3.0] октан-3,7-дион
2		2-метил-2,4,6,8-тетрааза- бицикло[3.3.0]октан-3,7-дион

Шифр	Структурная формула	Название
3		2,6-диметил-2,4,6,8-тетрааза- бицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
4		2,4-диметил-2,4,6,8-тетрааза- бицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
5		2,8-диметил-2,4,6,8-тетрааза- бицикло[3.3.0]октан-3,7-дион
6		2,4,6,8-тетраметил-2,4,6,8- тетраазабицикло[3.3.0]октан- 3,7-дион
P1		2,4,6,8-тетраметилол-2,4,6,8- тетраазабицикло[3.3.0]октан- 3,7-дион
P2		2,4,6-триметилол-2,4,6,8- тетраазабицикло[3.3.0]октан- 3,7-дион
P3a	$HO \qquad HO \qquad HO \qquad HO \qquad N \qquad H \\ O \qquad N \qquad N \qquad H \\ O \qquad N \qquad H \\ HO \qquad HO \qquad H \\ O \qquad O \\ HO \qquad O \\ H \\ O \qquad O \\ O \\ H \\ O \\$	смесь 2,6-триметилол-2,4,6,8- тетраазабицикло[3.3.0]октан- 3,7-диона и 2,4-триметилол- 2,4,6,8-тетрааза- бицикло[3.3.0]октан-3,7- диона

Шифр	Структурная формула	Название
P3b		2,8-диметилол-2,4,6,8-тетра- азабицикло[3.3.0]октан-3,7- дион
P4		2-метилол-2,4,6,8-тетрааза- бицикло[3.3.0]октан-3,7-дион

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. She, N. Glycoluril-Derived Molecular Clips are Potent and Selective Receptors for Cationic Dyes in Water / N. She, D. Moncelet, L. Gilberg et al // Chemistry – A European Journal. – 2016. – N 22. – C. 15270–15279. DOI: 10.1002/chem.201601796

2. Lagona, J. The Cucurbit[*n*]uril Family / J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti et al // Angew. Chem. Int. Ed. – 2005. – V 44. – C. 4844–4870. DOI: 10.1002/anie.200460675

3. Wittenberg, J.B. A clipped [3]rotaxane derived from bis-nor-seco-cucurbit[10]uril / J.B. Wittenberg, M.G. Costales // Chem. Commun. – 2011. – V 47. – C. 9420–9422. DOI: 10.1039/c1cc13358f

4. Dhiman, R. Glycoluril derived cucurbituril analogues and the emergence of the most recent example: Tiarauril / R. Dhiman, S. Pen, P.K. Chandrakumar et al // Chem. Commun. – 2020. – V 56. – C. 2529–2537. DOI: 10.1039/c9cc07233k

5. Пат. US6376157B1 CША, G03F 7/40. Method of manufacturing a semiconductor device, chemical solution to form fine pattern, and semiconductor device / Тапака М., заявитель и патентообладатель Mitsubishi Denki Kabushiki Kaisha, Токио; 23.04.2002, Appl. №.: 09/539,862. – 9 c. *https://patents.google.com/patent/US6376157*

6. Ma, D. Acyclic cucurbit[*n*]uril molecular containers enhance the solubility and bioactivity of poorlysoluble pharmaceuticals / D. Ma, G. Hettiarachchi // Nat. Chem. – 2012. – V 4. – C. 503–510. DOI: 10.1038/NCHEM.1326

7. Liu, W. Hybrid Molecular Container Based on Glycoluril and Triptycene: Synthesis, Binding Properties, and Triggered Release / W. Liu, X. Lu, W. Xue et al // Chemistry – A European Journal. – 2018. – V 24. – C. 14101–14110. DOI: 10.1002/chem.201802981

8. Gilberg, L. Acyclic cucurbit[n]uril-type molecular containers: influence of glycoluril oligomer length on their function as solubilizing agents / L. Gilberg, B. Zhang, P. Zavalij et al // Org. Biomol. Chem. – 2015. – V 13. – C. 4041–4050. DOI: 10.1039/c5ob00184f

9. Assaf, K.I. Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis / K.I. Assaf, W.M. Nau // Chem. Soc. Rev. – 2015. – V 44. – C. 394–418. DOI: 10.1039/c4cs00273c

10. Glass, M. A Multi-Component Sensor System for Detection of Amphiphilic Compounds / M. Glass, S. Xu, T.E. Kelley // Angew. Chem. Int. Ed. – 2018. – V 57. – C. 12741–12744. DOI: 10.1002/anie.201807221.

11. Park, K.M. Dye-Cucurbit[*n*]uril Complexes as Sensor Elements for Reliable Pattern Recognition of Biogenic Polyamines / K.M. Park, J. Kim, Y.H. Ko et al // Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 2018. –V 91. – C. 95–99. DOI: 10.1246/bcsj.20170302.

12. ЛП-003397 «Тетраметилтетраазабициклооктандион» [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств Минздрава России. – 2020. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=513de8bf-aaad-4ad6-87bd-7fc7258531e1&t=

13. Rongzu, H. Kinetics and mechanism of the exothermic first-stage decomposition reaction for 1,4-dinitro-3,6-bis(trinitroethyl)glycoluril / H. Rongzu, Y. Desuo // Thermochimica Acta. – 2002. – V 389. – C. 65–69. DOI: 10.1016/S0040-6031(02)00005-9

14. Yinon, J. Mass spectral fragmentation pathways in some glycoluril-type explosives. A study by collision-induced dissociation and isotope labeling / J. Yinon, S. Bulusu, T. Axenrod // Organic Mass Spectrometry. – 1994. – V 29. – C. 625–631. DOI: 10.1002/oms.1210291109

15. Пат. US4487938A CША, C07D 487/04. Tetranitroglycoluril and method of preparation thereof / J. Boileau, заявитель и патентообладатель Societe Nationale des Poudres et Explosifs, Париж; 11.12.1984, Appl. №.: 420,810. – 5 c. https://patents.google.com/patent/US4487938A/en

16. Boileau, J. Derives nitres acetyles du glycolurile / J. Boileau, M. Carail, E. Wimmer et al // Propellants, Explosives, Pyrotechnics. – 1985. – V 10. – C. 118–120. DOI: 10.1002/prep.19850100407

17. Jacobs, W. Durable glossy, matte and wrinkle finish powder coatings crosslinked with tetramethoxymethyl glycoluril / W. Jacobs, D. Foster, S. Sansur et al // Progress in Organic Coatings. – 1996. – V 29. – C. 127–138. DOI: 10.1016/s0300-9440(96)00643-1

18. Heraeus Epurio Crosslinkers. Ultra Pure Electronic Chemicals [Электронный ресурс] // Технологический концерн Heraeus. – 2020. – Режим доступа: https://www.heraeus.com/media/ media/hec/media_hec/products_hec/ultra_pure_chemicals_pics/HEP200002_CA_Organic_Chemicals_ V06_final_WEB.pdf

19. Summary of data for chemical selection. Glycoluril [Электронный ресурс] // Национальная токсикологическая программа Министерства здравоохранения и социальных служб США. – 1997. – Режим доступа: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/ exsumpdf/glycoluril_508.pdf

20. Федеральный регистр Агентства по охране окружающей среды США [Электронный pecypc] // Federal Register. – 1998. – V 63. – N 152. – С. 42554–42559. – Режим доступа: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/42nd.pdf

21. Acetylenediurea for synthesis. Material safety data sheet [Электронный ресурс] // Фармацевтическая компания Merck KGaA. – 2013. – Режим доступа: https://us.vwr.com/assetsvc/ asset/en_US/id/12277758/contents/12277758.pdf

22. Wheate, N.J. Improving platinum(II)-based anticancer drug delivery using cucurbit[*n*]urils / N.J. Wheate // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2008. – V 102. – C. 2060–2066. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2008.06.005

23. Wheate, N.J. Multi-nuclear platinum complexes encapsulated in cucurbit[n]uril as an approach to reduce toxicity in cancer treatment / N.J. Wheate, A.I. Day, R.J. Blanch, et al // Chem Commun (Camb). – 2004. – V 12. – C. 1424–1425. DOI: 10.1039/B404358H

24. Zhao, Y. Synthesis, cytotoxicity and cucurbituril binding of triamine linked dinuclear platinum complexes / Y. Zhao, M.S. Bali, C. Cullinane, A.I. Day et al // Dalton Transactions. – 2009. – V 26. – C. 5190–5198. DOI: 10.1039/b905112k

25. Buczkowski, A. Calorimetric and spectroscopic investigations of interactions between cucurbituril Q7 and gemcitabine in aqueous solutions / A. Buczkowski, A. Stepniak, P. Urbaniak et al // J Therm Anal Calorim. – 2018. – V 134. – C. 595–607 DOI: 10.1007/s10973-018-7295-7

26. Sal'keeva, L. K. Effect of glycoluril and its derivatives on the flame resistance and physicomechanical properties of rubber / L.K. Sal'keeva, A.A. Bakibaev, G.T. Khasenova, et al // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2018. – V 89. – C. 132–139. DOI: 10.1134/s1070427216010213

27. Jacobs, W. Durable glossy, matte and wrinkle finish powder coatings crosslinked with tetramethoxymethyl glycoluril / W. Jacobs, D. Foster, S. Sansur et al // Progress in Organic Coatings. – 1996. – V 29. – C. 127–138. DOI: 10.1016/s0300-9440(96)00643-1

28. Пат. US2803564A CША. Acetilene diurea-formaldehyde reaction product and treatment of textiles therewith / D.M. Gagarin, заявитель и патентообладатель Dan River Mills Inc., Вирджиния; 20.08.1957, Serial. №: 355,884. – 3 с. *https://patents.google.com/patent/US2803564A/en*

29. Пат. US20130237470A1 США. Detergents with antimicrobial effect / D. Bockmuehl, заявитель и патентообладатель HENKEL AG & CO. KGAA, Дюссельдорф; 20.08.1957, Appl. №: 13/870,211. – 5 c. *https://patents.google.com/patent/US20130237470A1/en*

30. Tetrahydro-1,3,4,6-tetrakis(hydroxymethyl)imidazo[4,5-*d*]imidazole-2,5(1*H*,3*H*)-dione. Substance Infocard [Электронный ресурс] // Агентство по химикатам Европейского союза. – 2020. – Режим доступа: https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.024.007

31. Пат. US5182328A CIIIA. RF curable Type I wood adhesive composition comprising vinyl acetate/NMA copolymer emulsions containing tetramethylol glycoluril / J.G. Iacoveillo, D.W. Horwat, заявитель и патентообладатель Air Products and Chemicals Inc., Аллентаун, Пенсильвания; 26.01.1993, Appl. №: 846,307. – 4 c. *https://patents.google.com/patent/US5182328A/en*

32. Lim, Y. Self-Assembled Ternary Complex of Cationic Dendrimer, Cucurbituril, and DNA: Noncovalent Strategy in Developing a Gene Delivery Carrier / Y. Lim, T. Kim, J. Lee et al // Bioconjugate Chemistry. – 2002. – V 13. – C. 1181–1185. DOI: 10.1021/bc025581r

33. Isobe, H. Ternary Complexes Between DNA, Polyamine, and Cucurbituril: A Modular Approach to DNA-Binding Molecules / H. Isobe, N. Tomita, J.W. Lee et al // Angewandte Chemie. – 2000. – V 39. – C. 4257–4260. DOI: 10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4257::AID-ANIE4257>3.0.CO;2-6

34. Xu, M. A Multi-Component Sensor System for Detection of Amphiphilic Compounds /
M. Xu, S. Kelley, T.E. Glass // Angewandte Chemie International Edition. – 2018. – V 57. –
C. 12741–12744. DOI: 10.1002/anie.201807221

35. Park, K.M. Dye-Cucurbit[n]uril Complexes as Sensor Elements for Reliable Pattern Recognition of Biogenic Polyamines / K.M. Park, J. Kim, Y.H. Ko, et al // Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 2018. – V. 91. – C. 95–99. DOI: 10.1246/bcsj.20170302

36. Пат. CN101399316A KHP. Organic thin-film transistor and method for controlling surface energy of polymer material layer / F. Yang, M. Xu, заявитель и патентообладатель The Industrial Technology Research Institute, Синьчжу, Тайвань; 27.09.2007, Appl. №: 200710161979.0. – 21 с. *https://patents.google.com/patent/CN101399316A/en*

37. Cao, L. Cucurbit[7]uril Containers for Targeted Delivery of Oxaliplatin to Cancer Cells /
L. Cao, G. Hettiarachchi, V. Briken et al // Angewandte Chemie International Edition. – 2013. –
V 52. – C. 12033–12037. DOI: 10.1002/anie.201305061

38. Ozkan, M. Rotaxane-Based Photosensitizer for Photodynamic Therapy / M. Ozkan,
Y. Keser, S. Hadi et al // European Journal of Organic Chemistry. – 2019. – V 21. – C. 3534–3541.
DOI: 10.1002/ejoc.201900278

39. Das, D. Applications of Cucurbiturils in Medicinal Chemistry and Chemical Biology [Электронный ресурс] / D. Das, K.I. Assaf, W.M. Nau // Front. Chem. – 2019. – V 7. Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00619

40. Wang, T. Facile one-pot synthesis of glycoluril-based porous organic polymers / T. Wang, Y.-C. Zhao, M. Luo et al // Polymer. – 2015. – V 60. – C. 26–31. DOI: 10.1016/j.polymer.2014.12.072

41. Rongzu, H. Kinetics and mechanism of the exothermic first-stage decomposition reaction for 1,4-dinitro-3,6-bis(trinitroethyl) glycoluril / H. Rongzu, Y. Desuo // Thermochimica Acta. – 2002. – V 389. – C. 65–69. DOI: 10.1016/S0040-6031(02)00005-9

42. Yinon, J. Mass spectral fragmentation pathways in some glycoluril-type explosives. A study by collision-induced dissociation and isotope labeling / J. Yinon, S. Bulusu, T. Axenrod et al // Organic Mass Spectrometry. – 1994. – V 29. – C. 625–631. DOI: 10.1002/oms.1210291109

43. Пат. US4487938A CША. Tetranitroglycoluril and method of preparation thereof / J. Boileau, J.-M. Emeury, заявитель и патентообладатель Societe Nationale des Poudres et Explosifs, Париж; 11.12.1984, Appl. №: 420,810. – 5 с.

https://patents.google.com/patent/US4487938A/en

44. Boileau, J. Derives nitres acetyles du glycolurile / J. Boileau, M. Carail, E. Wimmer et al // Propellants, Explosives, Pyrotechnics. – 1985. – V 10. – C. 118–120. DOI: 10.1002/prep.19850100407 45. Moradi, S. Synthesis of a Biological-Based Glycoluril with Phosphorous Acid Tags as a New Nanostructured Catalyst: Application for the Synthesis of Novel Natural Henna-Based Compounds / S. Moradi, M.A. Zolfigol // Chemistry Select. – 2018. – V 3. – C. 3042–3047. DOI: 10.1002/slct.201702544

46. Funk, S. Cucurbiturils in supramolecular catalysis / S. Funk, J. Schatz // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2019. – V 96. – C. 1–27. DOI: 10.1007/s10847-019-00956-0

47. Patel, P. Glycoluril: A heterogeneous organocatalyst for oxidation of alcohols and benzylic sp3 carbons / P. Patel, S. Nandi, T. Menapara et al // Applied Catalysis A: General. – 2018. – V 565. – C. 127–134. DOI: 10.1016/j.apcata.2018.08.005

48. Kravchenko, A.N. Synthesis of 2-monofunctionalized 2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-diones / A.N. Kravchenko, E.Yu. Maksareva, P.A. Belyakov et al // Russian Chemical Bulletin. – 2003. – V 52. – C. 192–197. DOI: 10.1023/A:1022473004714

49. Xu, S. Glycoluril / S. Xu, K.P. Gantzel, L.B. Clark // Acta Crystallographica. – 1994. – N 50, C. 1988–1989. DOI: 10.1107/S0108270194006955

50. Baeyer, A. Gesammelte Werke // A. Baeyer. – Frankfurt.: Salzwasser-Verlag GmbH, 1905. – C. 165. ISBN: 3864449081

51. Behrend, R. Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd / R. Behrend, E. Meyer, R. Rusche // Justus Liebig's Annalen Der Chemie. – 1905. – V 339. – C. 1–37. DOI: 10.1002/jlac.19053390102

52. Glycoluril. Certificate of Analysis [Электронный ресурс] // Saint Louis, USA: Sigma-Aldrich. – 2020. – N MKCM5831. – 1 с. – Режим доступа: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/g7305

53. Vessally, E. Synthesis of the glycoluril derivatives by the HZSM-5 nanozeolite as a catalyst / E. Vessally, M.D. Esrafili, Z. Alimadadi et al // Green Chemistry Letters and Reviews. – 2014. – V 7. – C. 119–125. DOI: 10.1080/17518253.2014.895865

54. Saghanezhad, S.J. Cucurbit[6]uril-OSO3H: a novel acidic nanocatalyst for the one-pot preparation of 14-aryl-14*H*-dibenzo[*a*,*j*]xanthenes and 1,8-dioxo-octahydro-xanthenes / S.J. Saghanezhad, Y. Nazari, F. Davod // RSC Advances. – 2016. – V. 6. – C. 25525–25530. DOI: 10.1039/c6ra02255c

55. Liu, W. A Glycoluril Dimer–Triptycene Hybrid Receptor: Synthesis and Molecular Recognition Properties / W. Liu, X. Lu, Z. Meng et al // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2018. – V 16. – C. 6499–6506. DOI: 10.1039/c8ob01575a

56. Stancl, M. Synthesis and supramolecular properties of glycoluril tetramer / M. Stancl, L. Gilberg, L. Ustrnul et al // Supramolecular Chemistry. – 2013. – V 26. – C. 168–172. DOI: 10.1080/10610278.2013.842643

57. Benyettou, F. Toward theranostic nanoparticles: CB[7]-functionalized iron oxide for drug delivery and MRI / F. Benyettou, I. Milosevic, Y. Lalatonne et al // Journal of Materials Chemistry B. – 2013. – V 1. – C. 5076–5082. DOI: 10.1039/c3tb20852d

58. Sinitsyna, A.A. *N*-Alkylation Reaction in the Synthesis of Tetra-Substituted Glycoluryls /
A.A. Sinitsyna, S.G. Il'yasov // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. – 2020. – V 13. –
C. 40–45. DOI: 10.17516/1998-2836-0164

59. Чикина, М.В. Исследование влияния окислителя на процесс получения 1,5-диамино-3,7-диоксо-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октана / М.В. Чикина, С.Г. Ильясов, А.А. Синицына // Ползуновский вестник. – 2018. – N 3. – С. 103–109. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.03.018

60. Пат. EP3553066A1 Европейского союза. Glycoluril ring-containing organosilicon compound and making method / Nyugaku T., заявитель и патентообладатель Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Токио; 16.10.2019, Appl. №.: 19167462.1. – 22 с.

https://patents.google.com/patent/EP3553066A1/en

61. Sal'keeva, L.K. New Phosphorylated Glycoluril Derivatives / L.K. Sal'keeva, E.K. Taishibekova, A.A. Bakibaev et al // Russian Journal of General Chemistry. – 2017. – V 87. – C. 442–446. DOI: 10.1134/S1070363217030124

62. Gazieva, G.A. Crystal structure, IR and ¹H-NMR spectra of tetranitratobis μ -(2,4,6,8-tetraethyl-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-dione-O,O')]diethanolodicadmium / G.A. Gazieva, D.G. Golovanov, P.V. Lozhkin et al // Russian Journal of Inorganic Chemistry. – 2007. – V 52. – C. 1441–1445. DOI: 10.1134/s0036023607090215

63. Чикина, М.В. Методы синтеза азотсодержащих циклических соединений на основе глиоксаля и его производных реакцией переиминирования : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.03 / Майя Викторовна Чикина. – Бийск, 2016. – 93 с.

64. DePablo, R.S. Determination of Total Glycoluril in Swimming Pool Water / R.S. DePablo // Journal of American Water Works Association. – 1966. – V 58. – C. 379–382. DOI: 10.1002/j.1551-8833.1966.tb01592.x

65. Phenyl Urea [Электронный ресурс] // The NIST, Национальный институт стандартов и технологий США. – 2020. – Режим доступа: https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Source =1953GRA86

66. Patel, C. Investigation of reaction intermediates of the urea-diacetylmonoxime reaction / C. Patel, R.J. Thibert, B. Zak // Clinical Biochemistry. – 1979. – V 12. – C. 126–129. DOI: 10.1016/s0009-9120(79)80138-1

67. Deshpande, M.S. Ruthenium(II) Complexes of Bipyridine–Glycoluril and their Interactions with DNA / M.S. Deshpande, A.A. Kumbhar, A.S. Kumbhakar et al // Bioconjugate Chemistry. – 2009. – V 20. – C. 447–459. DOI: 10.1021/bc800298t

68. Yan, Q. A New Fluorescent Sensor for Fe³⁺ Based on Glycoluril Molecular Clip / Q. Yan,
W. Liu, H. Wen et al // Chemistry Select. – 2020. – V 5. – C. 1878–1883.
DOI: 10.1002/slct.201904902

69. Li, L. New fluorescent probes based on supramolecular diastereomers for the detection of 2-nitrophenol / L. Li, Y. Sun, S. Wang et al // Talanta. – 2010. – V 81. – C. 1643–1649. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.03.018

70. Martinez, C.R. Rethinking the term «pi-stacking» / C.R. Martinez, B.L. Iverson // Chemical Science. – 2012. – V 3. – C. 2191–2201. DOI: 10.1039/c2sc20045g

71. Azam, A. A novel dansyl-appended glycoluril-based fluorescence sensor for silver ions / A. Azam, H.M. Chawla, S. Pandey // Tetrahedron Letters. – 2010. – V 51. – C. 4710–4711. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.07.005

72. Montes-Navajas, P. Complexation and Fluorescence of Tricyclic Basic Dyes Encapsulated in Cucurbiturils / P. Montes-Navajas, A. Corma, H. Garcia // ChemPhysChem. – 2008. – V 9. – C. 713–720. DOI: 10.1002/cphc.200700735

73. Wagner, B.D. Cucurbit[6]uril Analogue: Host Properties Monitored by Fluorescence Spectroscopy / B. D. Wagner, P.G. Boland, J. Lagona et al // J. Phys. Chem. B. – 2005. – V 109. – C. 7686–7691. DOI: 10.1021/jp044369c

74. Costa, A.L. Evaluation of the supramolecular interaction of Congo red with cucurbiturils using mass spectrometry and spectroscopic methods / A.L. Costa, A.C. Gomes, A.D. Lopes et al // New Journal of Chemistry. – 2020. – V 44. – C. 2587–2596. DOI: 10.1039/c9nj05706d

75. Koner, A.L. Cucurbituril Encapsulation of Fluorescent Dyes / A.L. Koner, W.M. Nau // Supramolecular Chemistry. – 2007. – V 19. – C. 55–66. DOI: 10.1080/10610270600910749

76. Dong, N. Preparation and characterization of inclusion complexes of antitumor camptothecin with cucurbit[n = 7, 8]urils / N. Dong, M. Dong, A. Zhao et al // Science China Chemistry. – 2010. – V 53. – C. 2304–2310. DOI: 10.1007/s11426-010-4067-z

77. Lisbjerg, M. Biotin[6]uril Esters: Chloride-Selective Transmembrane Anion Carriers Employing C-H-Anion Interactions / M. Lisbjerg, H. Valkenier, B.M. Jessen et al // J. Am. Chem. Soc. - 2015. – V 137. – C. 4948–4951. DOI: 10.1021/jacs.5b02306

78. Balzani V. Molecular Devices and Machines: Concepts and Perspectives for the Nanoworld / V. Balzani, A.Credi, M. Venturi – 2-е изд., – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. – 588 с. ISBN: 9783527318001, DOI: 10.1002/9783527621682

79. Jun, S.I. Rotaxane-based molecular switch with fluorescence signaling / S. Jun, J.W. Lee, S. Sakamoto et al // Tetrahedron Letters. – 2000. – V 41. – C. 471–475. DOI: 10.1016/s0040-4039(99)02094-8

80. Panshina, S.Y. Study of glycoluril and its derivatives by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy /S.Y. Panshina, O.V. Ponomarenko, A.A. Bakibaev et al // Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series. $-2020. - V 97. - N_{2} 3.$

81. Bakibaev, A.A. NMR spectra of phosphorylated carbamide-containing heterocycles: peculiarities of chemical shifts from the valence state of the phosphorus and the size of the cycle / A.A. Bakibaev, K.B. Zhumanov, S.Yu. Panshina et al // News of the Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan, series chemistry and technology. – 2019. – V 5. – N 473. – C. 100–107. DOI: 0.32014/2019.2518-1491.60

82. Mason, J. Nitrogen NMR Spectroscopy of Metal Nitrosyls and Related Compounds /
J. Mason, L.F. Larkworthy, E.A. Moore // Chemical Reviews. – 2002. – V 102. – C. 913–934.
DOI: 10.1021/cr000075115

83. Chegaev, K.Yu. New Functional Glycoluril Derivatives / K.Yu. Chegaev, O.V. Lebedev, A.N. Kravchenko et al // Mendeleev Communications. – 2011. – V 11. – C. 32–33. DOI: 10.1070/MC2001v011n01ABEH00135716

84. Barrow, S.J. Cucurbituril-Based Molecular Recognition / S.J. Barrow, S. Kasera, M.J. Rowland et al // Chemical Reviews. – 2015. – V 115. – C. 12320–12406.

DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00341

85. Havel, V. Modulation of Bambusuril Anion Affinity in Water / V. Havel, M. Babiak,
V. Sindelar // Chemistry – A European Journal. – 2017. – V 23. – C. 8963–8968.

DOI: 10.1002/chem.201701316

86. Svec, J. Bambus[6]uril / J. Svec, M. Necas, V. Sindelar // Angew. – Chem. Int. Ed. – 2010. – V 49. – C. 2378–2381. DOI: 10.1002/anie.201000420

87. Panshina, S.Y. Analysis of X-ray structural parameters of glycoluril and its derivatives / S.Y. Panshina, O.V. Ponomarenko, A.A. Bakibaev et al // Journal of Structural Chemistry. – 2020. – V $61. - N_{2} 12$.

88. Stancl, M. Glycoluril Dimer Isomerization under Aqueous Acidic Conditions Related to Cucurbituril Formation / M. Stancl, Z. Gargulakova, V. Sindelar // The Journal of Organic Chemistry. – 2012. – V 77. – C. 10945–10948. DOI: 10.1021/jo302063j

89. Burnett, C.A. Preparation of glycoluril monomers for expanded cucurbit[n]uril synthesis /
C.A. Burnett, J. Lagona, A. Wu et al // Tetrahedron. – 2003. – V 59. – C. 1961–1970.
DOI: 10.1016/s0040-4020(03)00150-9

90. Ndendjio, S.Z. Triptycene Walled Glycoluril Trimer: Synthesis and Recognition Properties / S.Z. Ndendjio, W. Liu, N. Yvanez et al // New Journal of Chemistry. – 2020. – V 44. – C. 338–345. DOI: 10.1039/c9nj05336k

91. Rodrigues, M.A. ESI-MS of Cucurbituril Complexes Under Negative Polarity / M.A. Rodrigues, D.C. Mendes, V. Ramamurthy et al // Journal of The American Society for Mass Spectrometry. – 2017. – V 28. – C. 2508–2514. DOI: 10.1007/s13361-017-1758-0

92. Stancl, M. 1,6-Dibenzylglycoluril for synthesis of deprotected glycoluril dimmer / M. Stancl, M.S.A. Khan, V. Sindelar // Tetrahedron. – 2011. – V 67. – № 46. – C. 8937–8941. DOI: 10.1016/j.tet.2011.08.097

93. Moradi, S. Synthesis of a Biological-Based Glycoluril with Phosphorous Acid Tags as a New Nanostructured Catalyst: Application for the Synthesis of Novel Natural Henna-Based Compounds / S. Moradi, M.A. Zolfigol, M. Zarei et al // Chemistry Select. – 2018. – V 3. – C. 3042–3047. DOI: 10.1002/slct.201702544

94. Yinon, J. Mass spectral fragmentation pathways in some glycoluril-type explosives. A study by collision-induced dissociation and isotope labeling / J. Yinon, S. Bulusu, T. Axenrod et al // Organic Mass Spectrometry. – 1994. – V 29. – C. 625–631. DOI: 10.1002/oms.1210291109

95. Ding, J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of polyamines in plant micro-tissues using cucurbituril as a host molecule / J. Ding, S. Liu, H. Xiao et al // Analytica Chimica Acta. – 2017. – V 987. – C. 56–63. DOI: 10.1016/j.aca.2017.08.027

96. Magalhães, C.I.R. Ferrocene and ferrocenium inclusion compounds with cucurbiturils: a study of metal atom dynamics probed by Mössbauer spectroscopy / C.I.R. Magalhães, A.C. Gomes, A.D. Lopes et al // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2017. – V 19. – C. 21548–21555. DOI: 10.1039/c7cp04416j

97. Day, A.I. A Cucurbituril-Based Gyroscane: A New Supramolecular Form / A.I. Day, R.J. Blanch, A.P. Arnold // Angewandte Chemie International Edition. – 2002. – V 41. – C. 275–277. DOI: 10.1002/1521-3773(20020118)41:2<275::aid-anie275>3.0.co;2-m

98. Costa, A.L. Evaluation of the supramolecular interaction of Congo red with cucurbiturils using mass spectrometry and spectroscopic methods / A.L. Costa, A.C. Gomes, A.D. Lopes et al // New Journal of Chemistry. – 2020. – V 44. – C. 2587–2596. DOI: 10.1039/c9nj05706d

99. Chen, Y. Structural interrogation of a cucurbit[7]uril-ferrocene host-guest complex in the solid state: a Raman spectroscopy study / Y. Chen, A. Klimczak, E. Galoppini et al // RSC Adv. - 2013. - V 3. - C. 1354-1358. DOI: 10.1039/c2ra21584e

100. Gürbüz, S. Cucurbituril-based supramolecular engineered nanostructured materials / S. Gürbüz, M. Idris, D. Tuncel // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2015. – V 13. – C. 330–347. DOI: 10.1039/c4ob02065k

101. Cicolani, R.S. Formation of the non-classical interhalide anion $[I_2Cl]^-$ in methylbambus[6]uril cavity / R.S. Cicolani, A.G.S. de Oliveira-Filho, A.P. de Lima Batista et al // New Journal of Chemistry. – 2020. – V 44. – C. 2697–2700. DOI: 10.1039/c9nj05352b

102. Trubina, S. EXAFS spectroscopy investigation Cu(II) complexes encapsulated in cucurbit[8]uril / S. Trubina, S. Erenburg, N. Bausk et al // Journal of Physics: Conference Series. – 2009. – V 190. – 012128. DOI: 10.1088/1742-6596/190/1/012128

103. Rawat, N. Complexation of U(VI) with Cucurbit[5]uril: Thermodynamic and Structural investigation in aqueous medium / N. Rawat, A. Kar, A. Bhattacharyya et al // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2019. – V 207. – C. 354–362.

DOI: 10.1016/j.saa.2018.09.037

104. Rawat, N. Complexation of Eu(iii) with Cucurbit[n]uril, n = 5 and 7: A Thermodynamic and Structural Study / N. Rawat, A. Kar, A. Bhattacharyya et al // Dalton Transactions. – 2005. – V 44. – C. 4246–4258. DOI: 10.1039/c4dt03623a

105. Ong, W. Unusual Electrochemical Properties of the Inclusion Complexes of Ferrocenium and Cobaltocenium with Cucurbit[7]uril / W. Ong, A.E. Kaifer // Organometallics. – 2003. – V 22. – C. 4181–4183. DOI: 10.1021/om030305x

106. Kaifer, A.E. Toward Reversible Control of Cucurbit[n]uril Complexes / A.E. Kaifer // Accounts of Chemical Research. – 2014. – V 47. – C. 2160–2167. DOI: 10.1021/ar5001204

107. Sal'keeva, L.K. Electrochemical Study of the Complex-Forming Properties of Phosphorylated Glucoluril / L.K. Sal'keeva, E.I. Korotkova, K.V. Dyorina et al // Russian Journal of General Chemistry. – 2019. – V 89. – C. 466–469. DOI: 10.1134/s1070363219030162

108. Дёрина К.В. Определение холестерина в пищевых продуктах вольтамперометрическим методом / К.В. Дёрина, Е.И. Короткова, Е.В. и др. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2016. – № 11. – С. 11–16.

109. Blanco, E. Polarographic study of the interaction between cucurbit[6]uril and divalent cations // E. Blanco, C. Quintana, P. Hernández et al // Modern Electroanalytical Methods. – 2009. – V 103. – C. 259.

110. Blanco, E. An Electrochemical Study of Cucurbit[6]uril–Cadmium(II) Interactions and the Effect of Electrolyte Cations and Guest Molecules / E. Blanco, C. Quintana, P. Hernández // Analytical Letters. – 2014. – V 48. C. 783–795. DOI: 10.1080/00032719.2014.961604

111. Zhu, C. Investigation on the hydrolytic mechanism of cucurbit[6]uril in alkaline solution /
C. Zhu, Z. Meng, W. Liu et al // 2018. Royal Society Open Science. – 2018. – V 5. 180038.
DOI: 10.1098/rsos.180038
112. Берлянд, А.С. Химико-фармацевтический анализ биологически активного вещества Альбикар / А.С. Берлянд, О.В. Лебедев, А.А. Прокопов // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Том 47, № 3. – С. 52–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-3-52-54

113. Прокопов, А.А. Методологические аспекты изучения экспериментальной фармакокинетики и метаболизма новых психотропных, ноотропных и антиоксидантных лекарственных средств : дис. ... доктора хим. наук : 15.00.02 / Прокопов Алексей Александрович. – М., 2006. – 328 с.

114. Берлянд, А.С. Анализ биологически активных бициклических бисмочевин методом ГЖХ / А.С. Берлянд, А.А. Прокопов // Здоровье и образование в XXI веке. – 2012. – № 2. – С. 35.

115. Разработка нормативно-технических требований, изучение фармакокинетики Альбикара, канцерогенности и тератогенности Альбикара [Текст] : отчет о НИР (заключ.) : ММСИ МЗ РСФСР / рук. А.З. Книджник, исполн.: А.С. Берлянд [и др.]. – М.: 1985. – 128 с. – Библиогр.: С. 104–108. – № ГР 01830067537. – Инв. № 0286 0 106120-.

116. Берлянд, А.С. Исследование гидролитической устойчивости биологически активного вещества Бикарэт / А.С. Берлянд, А.А. Прокопов // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Том 48, № 5. – С. 47–49. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-5-47-49

117. Rezaei-Seresht, E. Synthesis of Glycoluril Derivatives Catalyzed by Some Heteropolyoxometalates / E. Rezaei-Seresht, R. Tayebee // J. Chem. Pharm. Res. – 2011. – V 3. – C. 103–107.

118. Vessally, E. Synthesis of the glycoluril derivatives by the HZSM-5 nanozeolite as a catalyst / E. Vessally, M.D. Esrafili, Z. Alimadadi et al // Green Chemistry Letters and Reviews. – 2014. – V 7. – C. 119–125. DOI: 10.1080/17518253.2014.895865

119. Wu, A. Synthesis and Spectral Properties of Novel Fluorescent Diethoxycarbonyl Glycoluril Derivatives / A. Wu, N. She, M. Gao et al // Synlett. – 2007. – V 16. – C. 2533–2536. DOI: 10.1055/s-2007-986671

120. Qin, S.Q. 4,4'-[8b,8c-Bis(ethoxycarbonyl)-4,8-dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-2,3a,4a,6,
7a,8a-hexaazacyclopenta[*def*]fluorene-2,6-diyl]dipyridinium bis(tetrafluoridoborate) / S.-Q. Qin,
T. Pang, Y.-T. Li. // Acta Cryst. – 2008. – V 64. – C. o1689. DOI: 10.1107/S1600536808023635

121. Lu, L.-B. Synthesis and X-ray Structure of the Inclusion Complex of Dodecamethylcucurbit[6]uril with 1,4-Dihydroxybenzene / L.-B. Lu, Y.-Q. Zhang, Q.-J. Zhu et al // Molecules. – 2007. – V 12. – C. 716–722. DOI: 10.3390/12040716

122. Паньшина, С.Ю. Синтез 2-аминотиазола взаимодействием тетраацетилгликолурила с тиомочевиной в присутствии йода / С.Ю. Паньшина, С.И. Горбин; науч. рук. А.А. Бакибаев // Химия и химическая технология в XXI веке : материалы XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых, 20–23 мая 2019 г., г. Томск. – Томск : Изд-во ТПУ, 2019. – С. 195–196.

123. Hase, C. Umsetzung von Tetraacetylglykoluril mit Nucleophilen / C. Hase, D. Kühling // Justus Liebigs Annalen Der Chemie. – 1975. – V 1. – C. 95–102. DOI: 10.1002/jlac.197519750111

124. Bakibaev, A.A. Mechanochemical Activation of the Reaction of Tetraacetylglycoluril with Some Cyclic Primary Amines. Synthesis of Acetamides / A.A. Bakibaev, N.F. Khoang, V.V. Mamontov // Russian Journal of Organic Chemistry. – 2018. – V 54. – C. 668–669. DOI: 10.1134/s1070428018040292

125. Адаптол, таблетки 500 мг № 20 : сертификат качества № 43, серия 430618 : в соотв. с ЛС-001756-00700711 с изм. №1, №2 / утв.: Н. Вершиловска // 20.06.2018. Руницу : АО «Олайнфарм», 2018.

126. Альбикар. Предварительные нормативно-технические требования на период клинических испытаний [утв. Министерством здравоохранения СССР] / М.: Минздрав СССР. – 1985. – 4 с.

127 Бикарэт. Предварительные нормативно-технические требования на период клинических испытаний [утв. Министерством здравоохранения СССР] / М.: Минздрав СССР. – 1985. – 4 с.

128. Гончикова Ю.А. Совершенствование методов анализа антиретровирусных лекарственных средств : дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Гончикова Юлия Анатольевна. – Иркутск, 2018. – с. 102. http://www.igeb.ru/images/disovetd999.140.03/diss_gonchikova.pdf

129. Urbaniak, M. Synthesis of a monofunctional glycoluril molecular clip via cyclic imide formation on the convex site / M. Urbaniak, M. Gosecki, B. Gostynski et al // New Journal of Chemistry. – 2020. – V 44. – C. 596–604. DOI: 10.1039/c9nj04357h

130. Saloutina, L.V. Synthesis of Fluorine-Containing Imidazolidin-2-Ones, Glycolurils, and Hydantoins Based on Perfluorodiacetyl and Ureas / L.V. Saloutina, A.Y. Zapevalov, P.A. Slepukhin et al // Chem Heterocycl Comp. – 2014. – V 50. – C. 958–966. DOI: 10.1007/s10593-014-1550-z

131. Zhao, W.-X. A Hemimethyl-Substituted Cucurbit[7]uril Derived from 3α-Methylglycoluril / W.-X. Zhao, C.-Z. Wang, L.-X. Chen // Organic Letters. – 2015. – V 17. – № 20. – C. 5072–5075. DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02588 132. Panshina, S.Y. Tetrakis(hydroxymethyl)glycoluril in N-methylenation reactions with arylamines / S.Y. Panshina, O.V. Ponomarenko, A.A. Bakibaev // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2020. – V 56. – № 1. – C. 112–115. DOI: 10.1007/s10593-020-02633-4

133. Gazieva, G.A. Synthesis and structure of 2,4,6,8-tetramethyl-3,7-dithia-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane 3,3,7,7-tetraoxide / G.A. Gazieva, K.A. Lysenko, A.N. Kravchenko // Russian Journal of Organic Chemistry. $-2007. - V 43. - N \ge 11. - C. 1715-1718.$ DOI: 10.1134/s107042800711022x

134. Kravchenko, A.N. Reaction of N-alkylglycolurils with electrophilic reagents / A.N. Kravchenko, A.S. Sigachev, G.A. Gazieva // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2006. – V 42. – N_{2} 3. – C. 365–376. DOI: 10.1007/s10593-006-0094-2

135. Карташов, В.А. ТСХ-скрининг и индексы удерживания токсических веществ / В.А. Карташов // Вестник КазНМУ. – 2012. – № 1. – С. 430–436.

136. Ammann, E.C.B. Purine metabolism of unicellular algae / E.C.B. Ammann, V.H. Lynch // Analytical Biochemistry. – 1964. – V 7. – № 4. – C. 387–392. DOI: 10.1016/0003-2697(64)90150-2

137. Wu, A. Glycoluril derivatives form hydrogen bonded tapes rather than cucurbit[n]uril congeners / A. Wu, J.C. Fettinger, L. Isaacs // Tetrahedron. – 2002. – V 58. – № 49. – C. 9769–9777. DOI: 10.1016/S0040-4020(02)01307-8

138. Poskrobko, M. HPLC Analysis of the Products of the Reaction Between Glycoluril and Formaldehyde / M. Poskrobko, M. Dejnega // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 1998. – V 21. – № 17. – C. 2725–2731. DOI: 10.1080/10826079808003419

139. Hidalgo-Fernandez, P. Avidin and streptavidin ligands based on the glycoluril bicyclic system / P. Hidalgo-Fernández, E. Ayet, I. Canal // Org. Biomol. Chem. – 2006. – V 4. – № 16. – C. 3147–3154. DOI: 10.1039/b605081f

140. Kravchenko, A.N. Synthesis of new chiral mono-, di-, tri-, and tetraalkylglycolurils / A.N. Kravchenko, A.S. Sigachev, E.Y. Maksareva // Russian Chemical Bulletin. – 2005. – V 54. – № 3. – C. 691–704. DOI: 10.1007/s11172-005-0307-3

141. Kravchenko, A.N. 4,5-Dihydroxyimidazolidin-2-ones in the α -ureidoalkylation reaction of N-(carboxyalkyl)-, N-(hydroxyalkyl)-, and N-(aminoalkyl)ureas 1. α -Ureidoalkylation of N-(carboxyalkyl)ureas / A.N. Kravchenko, K.A. Lyssenko, I.E. Chikunov // Russian Chemical Bulletin. – 2009. – V 58. – No 2. – C. 395–405. DOI: 10.1007/s11172-009-0165-5

142. Lizal, T. Bambusuril analogs based on alternating glycoluril and xylylene units / T. Lizal,
V. Sindelar // Beilstein Journal of Organic Chemistry. – 2019. – V 15. – C. 1268–1274.
DOI: 10.3762/bjoc.15

143. Пат. RU2576240C1 РФ. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию глицина и тетраметилтетраазабициклооктандиона (варианты) / Т.Ш. Ханнанов, А.Н. Анисимов, С.С. Камаева и др., заявитель и патентообладатель ОАО «Татхимфармпрепараты», Казань; 11.02.2015, Бюл. № 6. – 13 с. https://patents.google.com/patent/RU2576240C1

144. N,N',N'',N'''-Tetraacetylglycoluril, TCI America [Электронный ресурс] // Fisher Scientific. – 2020. – Режим доступа: https://www.fishersci.ca/shop/products/n-n-n-tetraacetylgly coluril-tci-america-2/p-7136535

145. Гончикова, Ю.А. Анализ комбинированных сочетаний лекарственных средств на основе абакавира, ламивудина, зидовудина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2018. – V 25. – № 3. – С. 46–50.

146. Johnson, D.W. Glycoluril ribbons tethered by complementary hydrogen bonds / D.W. Johnson, F. Hof, L.C. Palmer // Chem. Commun. – 2003. – № 14. – C. 1638–1639. DOI: 10.1039/b303508e

147. Stancl, M. 1,6-Dibenzylglycoluril for synthesis of deprotected glycoluril dimer / M. Stancl, M.S.A. Khan, V. Sindelar // Tetrahedron. – 2011. – V 67. – № 46. – C. 8937–8941. DOI: 10.1016/j.tet.2011.08.097

148. Huang, W.-H. Metal-Ion-Induced Folding and Dimerization of a Glycoluril Decamer in Water / W.-H. Huang, P.Y. Zavalij, L. Isaacs // Organic Letters. – 2009. – V 11. – № 17. – C. 3918–3921. DOI: 10.1021/ol901539q

149. Gosecki, M. Glycoluril Clips for the Construction of Chemoresponsive Supramolecular Polymer Networks through Homodimer Cross- Links / M. Gosecki, M. Urbaniak, M. Gosecka // ChemPlusChem. – 2019. – V 84. – № 7. – C. 981–988. DOI: 10.1002/cplu.201900367

150. Sorvanov, A.A. Development of new water-soluble polymers based on hydroxymethyl derivatives of glycoluril / A.A. Sorvanov, K.V. Rubtsov // Chemistry XVI International Conference of tudents, graduate students and young scientists Prospects of fundamental sciences development, April 23–26. – 2019. – V 2. – C. 204–206. *http://conf-prfn.org/Arch/Proceedings_2019_vol_2.pdf*

151. Takei, S. High-resolution nanopatterning of biodegradable polylactide by thermal nanoimprint lithography using gas permeable mold / S. Takei, M. Hanabata // AIP Advances. – 2017. – V 7. – N_{2} 3. – 035110. DOI: 10.1063/1.4978448

152. Strebl, M.G. Adamantane/Cucurbituril: A Potential Pretargeted Imaging Strategy in Immuno-PET / M.G. Strebl, J. Yang, L. Isaacs // Molecular Imaging. – 2018. – V 17. – 153601211879983. DOI: 10.1177/1536012118799838

153. Day, A. A Method for Synthesizing Partially Substituted Cucurbit[n]uril / A. Day, A. Arnold, R. Blanch // Molecules. – 2003. – V 8. – № 1. – C. 74–84. DOI: 10.3390/80100074

154. Пат. CN108276412A KHP. Glycoluril class with functional group and its utilization / T. Kumano, T. Takeda заявитель и патентообладатель Shikoku Chemicals corp., Mapyrame; 25.11.2013, – 113 c. https://patents.google.com/patent/CN108276412A/en

155. Ivanov, E.V. Enthalpy-related parameters of interaction of simplest α-amino acids with the pharmaceutical mebicar (N-tetramethylglycoluril) in water at 298.15 K / E.V. Ivanov, D.V. Batov // The Journal of Chemical Thermodynamics. – 2019. – V 128. – C. 159–163. DOI: 10.1016/j.jct.2018.08.022

156. Ivanov, E.V. Effect of the H/D solvent isotope substitution on enthalpy-related interaction parameters in aqueous solutions of the racemic Albicar at T = 298.15 K and ambient pressure / E.V. Ivanov, D.V. Batov // The Journal of Chemical Thermodynamics. – 2016. – V 102. – C. 9–11. DOI: 10.1016/j.jct.2016.06.020

157. Martin, A.J.P. A new form of chromatogram employing two liquid phases / A.J.P. Martin, R.L.M. Synge // Biochemical Journal. – 1941. – V 35. – № 12. – C. 1358–1368. DOI: 10.1042/bj0351358

158. Snyder, L.R. Introduction to Modern Liquid Chromatography / L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan – Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2009. – 912 c. ISBN 978-0-470-16754-0

159 Snyder, L.R.Practical HPLC Method Development / L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch – Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 1997. – 765 c. ISBN:9781118592014

160. Snyder, L.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography / L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant // Journal of Chromatography A. – 1979. – V 165. – № 1. – C. 3–30. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)85726-x

161. ГСИ Р 50.2.090-2013 Методики количественного химического анализа. Общие требования к разработке, аттестации и применению. – М.: Стандартинформ, 2014. – 18 с.

162. Wolfram|Alpha service [Электронный ресурс] / Wolfram Alpha LLC. – 2020. – Режим доступа: https://www.wolframalpha.com/

163. Валидация аналитических методик ОФС.1.1.0012.15 : Общая фармакопейная статья [Текст] / Государственная фармакопея Российской Федерации. – Том І. – М. : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – 13 с.

164. Kraiczek, K.G. Relation between Chromatographic Resolution and Signal-to-Noise Ratio in Spectrophotometric HPLC Detection / K.G. Kraiczek, G.P. Rozing, R. Zengerle // Analytical Chemistry. – 2013. – V 85. – № 10. – C. 4829–4835. DOI: 10.1021/ac4004387

165. Taylor, T. Important Aspects of UV Detection for HPLC / T. Taylor // LCGC North America. – 2015. – V 33. – № 11. – C. 870.

166. Meyer, C. Minimum required signal-to-noise ratio for optimal precision in HPLC and CE /
C. Meyer, P. Seiler, C. Bies // Electrophoresis. – 2012. – V 33. – № 11. – C. 1509–1516.
DOI: 10.1002/elps.201100694

167. Пат. US2802011 США. Manufacture of Allantoin / L.J. Chrismann, заявитель и патентообладатель Carbogen corp., Нью-Йорк; 6.08.1957, Apl. №.: 599,365. – 1 с. https://patentimages.storage.googleapis.com/bf/ab/f5/18f46e5603b4a6/US2802011.pdf

168. Kushcherbaeva, V.R. Study of hydrolytic stability of glycolurils under alkaline conditions / V.R. Kushcherbaeva, A.A. Bakibaev, D.A. Kurgachev // Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series. -2018. - V 91. - N = 3. - C. 46-50. DOI: 10.31489/2018Ch3/46-50

169. Пат. RU2708590C1 РФ. Способ очистки гликолурила от примеси гидантоина / Д.А. Кургачев, А.А. Бакибаев, Д.В. Новиков, заявитель и патентообладатель НИ ТГУ, Томск; 11.10.2019, Бюл. №.: 34. – 5 с. https://patents.google.com/patent/RU2708590C1

170. Фармацевтические субстанции ОФС.1.1.0006.15 : Общая фармакопейная статья [Текст] / Государственная фармакопея Российской Федерации. – Том I. – М. : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – 9 с.

171. Marchand, D.H. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography / D.H. Marchand, K. Croes, J.W. Dolan // Journal of Chromatography A. – 2005. – V 1062. – № 1. – C. 65–78. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.11.014

172. Euerby, M.R. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis / M.R. Euerby, P. Petersson // Journal of Chromatography A. – 2003. – V 26. – C. 295–306.

DOI: 10.1002/jssc.200390035

173. Marchand, D.H. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography / D.H. Marchand, K. Croes, J.W. Dolan // Journal of Chromatography A. – 2005. – V 1062. – № 1. – C. 65–78. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.11.014

174. Carr, P.W. Contributions to reversed-phase column selectivity. I. Steric interaction / P.W. Carr, J.W. Dolan, U.D. Neue // Journal of Chromatography A. – 2011. – V 1218. – № 13. – C. 1724–1742. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.047

175. Luna PFP column [Электронный ресурс] / Phenomenex. – 2020. – Режим доступа: https://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/5076_I_Luna_ PFP_Brochure.pdf

176. Kurgachev, D.A. Isolation, Identification, and Chromatographic Separation of N-Methyl Derivatives of Glycoluril / D.A. Kurgachev, O.A. Kotelnikov, D.V. Novikov et al // Chromatographia. -2018. - V 81. - N 10. - C. 1431-1437.

177. Meyer, C. Minimum required signal-to-noise ratio for optimal precision in HPLC and CE /
C. Meyer, P. Seiler, C. Bies // Electrophoresis. – 2012. – V 33. – № 11. – C. 1509–1516.
DOI: 10.1002/elps.201100694

178. Correia, H. Easy Synthesis of trans-4,5-Dihydroxy-2-imidazolidinone and 2,4-Dimethylglycoluril / H. Correia, R. Cicolani, R. Moral // Synthesis. – 2015. – V 48. – № 02. – C. 210–212. DOI: 10.1055/s-0035-1560831

179. Stancl, M. Novel Supramolecular Hosts Based on Linear and Cyclic Oligomers of Glycoluril / M. Stancl, J. Svec, V. Sindelar // Israel Journal of Chemistry. – 2011. – V 51. – № 5–6. – C. 592–599. DOI: 10.1002/ijch.201100028

180. Nematollahi, J. Imidazoimidazoles. I. The Reaction of Ureas With Glyoxal. Tetrahydroimidazo[4,5-d]imidazole-2,5-diones 1,2 / J. Nematollahi, R. Ketcham // The Journal of Organic Chemistry. – 1963. – V 28. – N_{2} 9. – C. 2378–2380. DOI: 10.1021/jo01044a055

181. Kushcherbaeva, V.R. Study of acid catalyzed synthesis and analytical preparative separation of the spatial isomers of N,N-dimethylglycoluril / V.R. Kushcherbaeva, A.A. Bakibaev, D.A. Kurgachev // Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series. – 2018. – V 91. – N $_{2}$ 3. – C. 51–57. DOI: 10.31489/2018Ch3/51-57

182. Пат. RU2665714C1 РФ. Способ выделения пространственных изомеров N,N'диметилгликолурила / Д.А. Кургачев, А.А. Бакибаев, В.С. Мальков, заявитель и патентообладатель НИ ТГУ, Томск; 28.12.2017, Бюл. №.: 25. – 7 с.