

Стахевич С.И.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ 2-(4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-2,3-ДИГИДРОКСИФЕНИЛСУЛЬФАНИЛ) КИСЛОТЫ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ОКИСЛЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра фармацевтической химии, г. Минск

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, комплекс серебра (I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусной кислотой.

**Резюме:** определены условия, позволяющие идентифицировать 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусную кислоту и ее примесь в субстанции комплекса Ag(I) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Resume:** the conditions have been determined, that allow to identify 2-[4,6-di(tert-butyl)-2,3-dihydroxyphenylsulfanyl] acetic and it's impurity in a substance of the Ag (I) complex using high-performance liquid chromatography.

**Актуальность.** Согласно данным, поступающим со всего мира, резистентность микроорганизмов к применяемым химиотерапевтическим средствам стремительно растет. Нерациональное использование антибиотиков как в медицине, так и ветеринарии создало огромные социально-экономические последствия для систем здравоохранения многих стран. Поэтому разработка новых антимикробных агентов с широким спектром активности и отличным от известных антибиотиков механизмом действия приобретает первостепенное значение. Среди таких соединений следует отметить комплексы серебра (I) с пространственно-экранированными *o*-дифенолами. На основании результатов работ [1, 2], в качестве соединения-лидера был выбран комплекс серебра (I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой ( $AgL_2$ ). Низкая токсичность и высокий уровень антимикробной активности этого соединения позволяет рассматривать его в качестве перспективного химиотерапевтического агента. Однако высокая реакционная способность производных *o*-дифенолов, в частности комплекса  $AgL_2$ , осложняет задачу его выделения в чистом виде. Было показано, что содержание окисленных форм в 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоте, используемой в качестве исходного реагента для синтеза  $AgL_2$ , приводит к снижению его стабильности при хранении и потере фармакологической активности [2].

**Цель:** идентификация 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)-уксусной кислоты и продуктов ее окисления методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Задачи:** 1. Выбор хроматографической системы, обеспечивающей разделение 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты и продуктов ее окисления; 2. Идентификация веществ, образующихся при хранении 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-

дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты, а также при разложении ее комплекса Ag(I).

**Материал и методы.** Синтез 2-(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусной кислоты (L) и ее комплекса AgL<sub>2</sub> проводили согласно методикам, описанным в работах [2, 3]. Хинон (2-(2,4-ди-*трет*-бутил-5,6-диоксоциклогекса-1,3-диен-1-ил) сульфанилуksусную кислоту, L<sub>ок</sub>) получали электрохимически в результате анодного окисления соединения L [2].

Для проведения хроматографического анализа указанных веществ использовался комплекс Shimadzu LC10-AD (Япония) со спектрофотометрическим детектором 190–900 нм. Разделение компонентов проводилось на колонке LiChroCART C18 (250 × 4 мм, 5 мкм, Merck, KGaA, Германия) при температуре 30°C с градиентным элюированием смесью ацетонитрил – вода (таблица 1), скоростью подвижной фазы 1 мл/мин, объемом вводимой пробы 20 мкл. Испытуемые растворы соединений L, L<sub>ок</sub> и AgL<sub>2</sub> (10<sup>-3</sup> моль/л) готовили с использованием ацетонитрила для ВЭЖХ, предварительно насыщенного аргоном.

**Таблица 1.** – Состав подвижной фазы

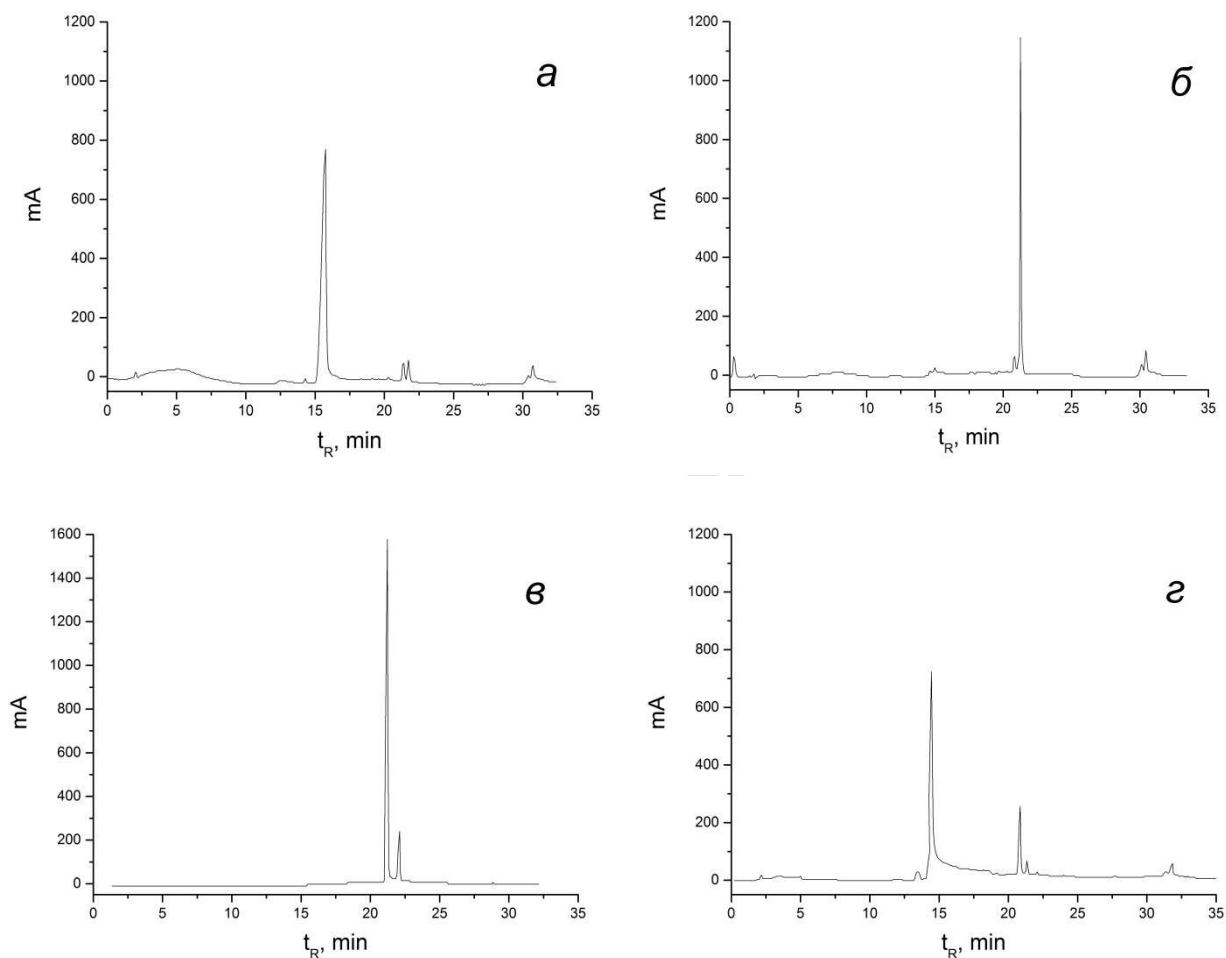
Время, мин	Ацетонитрил (% об/об)	Вода (% об/об)
0–5	20	80
5–15	20→100	80→0
15–25	100	0
25–30	100→20	0→80

**Результаты и их обсуждение.** При разработке методики хроматографического анализа соединения L и комплекса AgL<sub>2</sub> были подобраны условия, позволяющие добиться приемлемого разрешения между пиками определяемого вещества и основной примеси – хинона, образующего в результате окисления фенола L. Четкое разделение пиков ( $R_s > 8,5$ ) достигалось в режиме градиентного элюирования (таблица 1), позволившего, кроме того, в начале хроматографирования отделить гидрофильные примеси, которые могут содержаться в образцах соединения L (рисунок 1 а, б).

На хроматограмме свежесинтезированного образца L присутствует интенсивный пик с временем удерживания 15,8 минут, относящийся к его восстановленной (фенольной) форме, в то время как на хроматограмме образца, выдержанного в течение 5 лет на воздухе при температуре 20±5 °С, основной пик характеризуется временем удерживания 21,3 минуты и, вероятно, соответствует продукту окисления вещества L (рисунок 1 а, б).

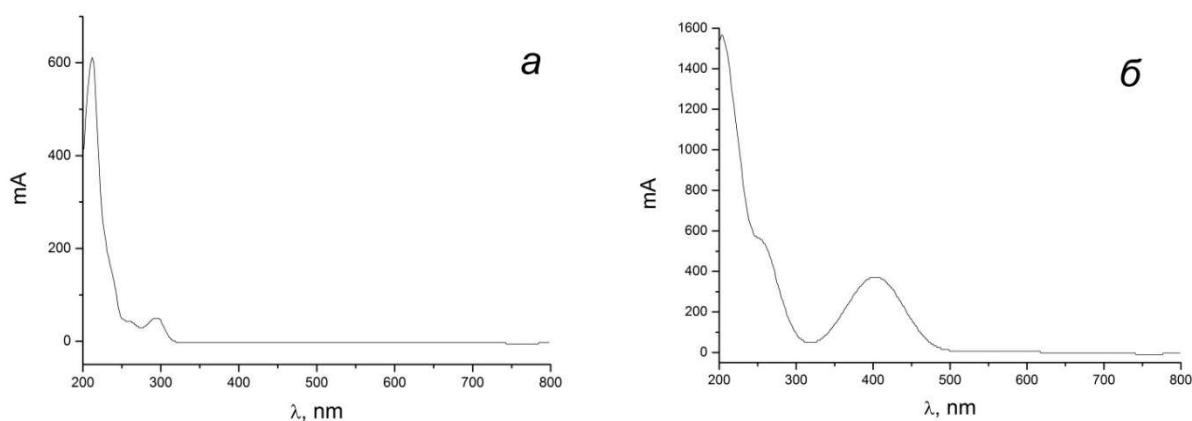
Для идентификации продукта окисления была зарегистрирована хроматограмма внешнего стандарта (хинона L<sub>ок</sub>), на которой наблюдается интенсивный сигнал с временем удерживания 21,2 минуты, что позволяет предположить, что в ходе хранения образца L происходит его окисление с образованием соответствующего хинона (рисунок 1 в). Это подтверждает сравнение

спектров поглощения образцов, зарегистрированных в процессе хроматографирования: в спектре образца, хранившегося в течение 5 лет, присутствует полоса с максимумом поглощения в области 400 нм, относящаяся к  $n \rightarrow \pi^*$  электронным переходам с участием карбонильной группы хинона (рисунок 2 а, б) [4].



**Рис. 1** Хроматограммы образцов: а – свежеприготовленного L; б – L, выдержанного в течение 5 лет; в –  $L_{ox}$ ; г –  $AgL_2$

При хроматографическом анализе комплекса  $AgL_2$  происходит его разложение из-за взаимодействия с элюентом (ацетонитрил – вода). Ранее было показано, что соединение  $AgL_2$  относится к комплексам с частичным переносом заряда. Его характерной особенностью является реализация в растворителях с высокой сольватирующей способностью (в частности, в воде) внутримолекулярного редокс-процесса, в результате чего происходит образование наночастиц серебра и хинона [5]. Подвижные фазы, пригодные для хроматографического анализа фенольных соединений содержат полярный растворитель, и в них происходит диссоциация  $AgL_2$  и последующее окисление фенольного лиганда ионами  $Ag(I)$ . Таким образом, на хроматограмме  $AgL_2$  (рисунок 1 г) наблюдается 2 основных пика, соответствующих лиганду L в фенольной форме ( $t_R=15,0$  мин) и хинону  $L_{ox}$  ( $t_R=21,2$  мин).



**Рис. 2** Спектры поглощения, соответствующие пикам на хроматограммах:

а – свежеприготовленного L ( $t_R=15,8$  мин); б – L, выдержанного в течение 5 лет ( $t_R=21,3$  мин).

**Выводы:** в режиме градиентного элюирования смесью ацетонитрил – вода произведено хроматографическое разделение ( $R_s > 8,5$ ) 2-(4,6-ди-*tert*-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты и продукта ее окисления. Показано, что в ходе хранения на воздухе 2-(4,6-ди-*tert*-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты, а также при разложении ее комплекса Ag(I) образуется хинон (2-((2,4-ди-*tert*-бутил-5,6-диоксоциклогекса-1,3-диен-1-ил)сульфанил)уксусной кислота) – примесь, содержание которой необходимо контролировать для обеспечения качества и стабильности комплекса Ag(I) с 2-(4,6-ди-*tert*-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой, перспективного антимикробного средства широкого спектра действия.

#### Литература

1. Redox-active silver(I) complexes with sterically hindered 1,2-dihydroxybenzene derivatives: reduction of cytochrome *c* and antimicrobial activity / N.V. Loginova [et al.] // R. Thom (Ed.). *Cytochromes b and c: Biochemical Properties, Biological Functions and Electrochemical Analysis*. – Nova Science Publisher's, Hauppauge. New York. – 2013. – P. 121–172.
2. Redox-active metal complexes of sterically hindered phenolic ligands: Antibacterial activity and reduction of cytochrome *c*. Part IV. Silver(I) complexes with hydrazone and thiosemicarbazone derivatives of 4,6-di-*tert*-butyl-2,3-dihydroxybenzaldehyde / N.V. Loginova [et al.] // *Polyhedron*. – 2015. – Vol. 88. – P. 125–137.
3. Pharmacologically active benzene derivatives: synthesis, complexation with biometals, and biological evaluation of sterically hindered 1,2-dihydroxybenzene and *o*-aminophenol derivatives / N.V. Loginova [et al.] // *Benzene and Its Derivatives* / ed. G. Tranfo. – Hauppauge, New York: Nova Science Publisher's, 2011. – P. 23–70.
4. Spruit, C.J.P. Absorption spectra of quinones. I. Naphthoquinones and naphthohydroquinones / C.J.P. Spruit // *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. – 2010. – Vol. 68. – № 4. – P. 309–324.
5. Чернявская, А.А. Комплексы серебра(I) с производными серосодержащих пирокатехинов как прекурсоры наночастиц серебра / А.А. Чернявская // *Молодежь в науке – 2004: сб. науч. тр. молодых ученых НАН Беларуси: в 2 т. / НАН Беларуси; редкол.: И.Д. Волоотовского, Ф.А. Лахвич. – Минск, 2004. – Т. 2. – С. 216–219.*