


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



Рік заснування – 1966

**ЖУРНАЛ
ОРГАНІЧНОЇ ТА
ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ХІМІЇ**

——
**JOURNAL
OF ORGANIC AND
PHARMACEUTICAL CHEMISTRY**

——
**ЖУРНАЛ
ОРГАНИЧЕСКОЙ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

2021 – том 19, выпуск 1 (73)

Харків
НФаУ

Головні редактори	Л. Ю. Клименко (Харків) В. І. Кальченко (Київ)
Заступники головного редактора	І. С. Гриценко (Харків) М. В. Вовк (Київ)
Відповідальні секретарі	Д. О. Лега (Харків) Т. А. Васільєва (Київ)
Науковий консультант	В. П. Черних (Харків)

Редакційна колегія:

М. К. Братенко (Чернівці), В. С. Броварець (Київ), Ж. Ф. Буйон (Руан, Франція), А. Варнек (Страсбург, Франція), З. В. Войтенко (Київ), В. А. Георгіянц (Харків), В. А. Загорій (Київ), Л. Запрутко (Познань, Польща), Л. Іванаускас (Каунас, Литва), А. Катц (Берклі, США), С. І. Коваленко (Запоріжжя), С. М. Коваленко (Харків), В. М. Ковальов (Харків), М. І. Короткіх (Київ), О. М. Костюк (Київ), Р. Б. Лесик (Львів), В. В. Ліпсон (Харків), В. П. Новіков (Львів), М. Д. Обушак (Львів), П. П. Онисько (Київ), О. Б. Смолій (Київ), В. М. Тимошенко (Київ), А. О. Толмачов (Київ), А. А. Фокін (Київ), Л. А. Шемчук (Харків), Ю. Л. Ягупольський (Київ)

Редакційна рада:

С. А. Андронаті (Одеса), І. С. Антипін (Казань, РФ), О. М. Біловол (Харків), А. І. Вовк (Київ), Б. С. Зіменковський (Львів), Г. Л. Камалов (Одеса), А. Хаас (Бохум, Німеччина), В. А. Чебанов (Харків), Ю. Г. Шермолович (Київ)

У журналі розглянуто проблеми синтезу й аналізу органічних та елементоорганічних сполук, аналогів природних сполук і лікарських субстанцій, результати фізико-хімічних досліджень у вищезазначених напрямках.

Для працівників науково-дослідних установ, вищих навчальних закладів та фахівців хімічного, фармацевтичного, біологічного, медичного і сільськогосподарського профілю.

“Журнал органічної та фармацевтичної хімії” внесено до затвердженого МОН України Переліку наукових фахових видань України (категорія “Б”) для опублікування результатів дисертаційних робіт за спеціальністю 102 – Хімія та 226 – Фармація, промислова фармація (наказ МОН України від 28.12.2019 р. № 1643); індексовано в наукометричних базах даних: Chemical Abstracts (CAS), Index Copernicus; внесено до каталогів та пошукових систем: Directory of Open Access Journals (DOAJ), Bielefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access scholarly Resources (ROAD), PKP Index, Ulrich’s periodicals, Worldcat, НБУ ім. В. І. Вернадського і УРЖ «Джерело».

Затверджено до друку вченою радою Інституту органічної хімії НАН України, протокол № 3 від 10.03.2021 р.

Затверджено до друку вченою радою Національного фармацевтичного університету, протокол № 2 від 24.02.2021 р.

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, Національний фармацевтичний університет, редакція «Журналу органічної та фармацевтичної хімії», тел./факс (572) 68-09-60. E-mail: press@nuph.edu.ua, orgpharm-journal@nuph.edu.ua. Сайт: <http://orphcj.nuph.edu.ua>

Передплатні індекси: для індивідуальних передплатників — 08383, для підприємств — 08384

Свідоцтво про державну реєстрацію серії КВ № 23086-12926ПР від 05.01.2018 р.

Підписано до друку 15.03.2021 р. Формат 60x84 1/8.

Папір офсетний. Друк ризо. Умовн. друк. арк. 9,3. Обліков.-вид. арк. 10,76. Тираж 50 прим.

Редактори — О. Ю. Гурко, Л. І. Дубовик. Комп’ютерне верстання — О. М. Білинська

«Журнал органічної та фармацевтичної хімії». Том 19, випуск 1 (73), 2021

ISSN 2308-8303 (Print)

ISSN 2518-1548 (Online)

I. G. Logvinenko^{1,2}, V. G. Dolovanyuk¹, I. S. Kondratov^{1,2}¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії імені В. П. Кухаря НАН України, Україна² ТОВ НВП «Єнамін», Україна

02094, м. Київ, вул. Червоноткацька, 78. E-mail: kondratov@mail.enamine.net

Препаративний метод синтезу 4-(трифлуорометокси)-піперидину та 4-(трифлуорометоксиметил)піперидину

Мета. Розробити зручний синтетичний метод для одержання мультиграмових кількостей 4-(трифлуорометокси)піперидину та 4-(трифлуорометоксиметил)піперидину – перспективних будівельних блоків для медичної хімії.

Результати та їх обговорення. Синтезовано 4-(трифлуорометокси)піперидин (8,4 г) та 4-(трифлуорометоксиметил)піперидин (12,9 г) у п'ять стадій, виходячи з 4-гідроксипіперидину (сумарний вихід – 40%) та 4-(гідроксиметил)піперидину (сумарний вихід – 13,5%) відповідно.

Експериментальна частина. Першою стадією синтетичної стратегії було ацилювання 4-гідроксипіперидину бензоїлхлоридом. Одержаний N-бензоїл-4-гідроксипіперидин було перетворено на N-бензоїл-4-трифлуорометоксипіперидин у дві стадії з використанням методу Хіяма (синтез відповідного S-метилксантату і наступні десульфурізація та флуорування з використанням N-бромосукциніміду та реагенту Ола). Далі N-бензоїльну групу було відновлено до бензильної, зняття якої проводили з використанням 1-хлороетилхлороформіату. Аналогічну схему було використано для синтезу 4-(трифлуорометоксиметил)піперидину, виходячи з 4-(гідроксиметил)піперидину. Структуру і склад синтезованих сполук доведено даними ¹H, ¹³C і ¹⁹F ЯМР-спектроскопії, мас-спектрометрії та елементного аналізу.

Висновки. Розроблений метод є зручним підходом до синтезу мультиграмових кількостей 4-(трифлуорометокси)піперидину та 4-(трифлуорометоксиметил)піперидину та може бути використаний для синтезу інших вторинних амінів, що містять CF₃O-групу.

Ключові слова: флуорування; трифлуорометоксигрупа; ксантат; піперидин; захисна група

I. G. Logvinenko^{1,2}, V. G. Dolovanyuk¹, I. S. Kondratov^{1,2}¹ V. P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine² Enamine Ltd, Ukraine

The preparative synthetic approach to 4-(trifluoromethoxy)piperidine and 4-(trifluoromethoxymethyl)piperidine

Aim. To develop a convenient synthetic approach for the preparation of multigram amounts of 4-(trifluoromethoxy)piperidine and 4-(trifluoromethoxymethyl)piperidine – promising building blocks for medicinal chemistry.

Results and discussion. 4-(Trifluoromethoxy)piperidine (8.4 g) and 4-(trifluoromethoxymethyl)piperidine (12.9 g) were synthesized in 5 stages starting from 4-hydroxypiperidine (the overall yield 40%) and 4-(hydroxymethyl)piperidine (the overall yield 13.5%), respectively.

Experimental part. The first stage of the synthetic strategy was acylation of 4-hydroxypiperidine with benzoyl chloride. N-benzoyl-4-hydroxypiperidine obtained was transformed to N-benzoyl-4-(trifluoromethoxy)piperidine in two stages using the Hiyama method (the synthesis of the corresponding S-methyl xanthate with the subsequent desulfurization/fluorination using N-bromosuccinimide and Olah's reagent). Then the N-benzoyl group was reduced to benzyl one, which was removed using 1-chloroethyl chloroformate. The similar approach was applied to the synthesis of 4-(trifluoromethoxymethyl)piperidine starting from 4-(hydroxymethyl)piperidine. The structure and composition of the compounds synthesized were confirmed by ¹H, ¹³C and ¹⁹F NMR spectroscopy, mass-spectrometry and elemental analysis.

Conclusions. The synthetic approach developed is a convenient method for the multigram preparation of 4-(trifluoromethoxy)piperidine and 4-(trifluoromethoxymethyl)piperidine and can be used for the synthesis of other secondary amines containing the CF₃O-group.

Key words: fluorination; trifluoromethoxy group; xanthate; piperidine; protection group

Copyright © 2021, I. G. Logvinenko, V. G. Dolovanyuk, I. S. Kondratov

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Введення флуоровмісних замісників в органічні сполуки все частіше використовують в агрохімії, розробці лікарських засобів, нових матеріалів тощо [1, 2]. Такий інтерес зумовлено насамперед унікальними електронними властивостями цих замісників та їхньою просторовою будовою. Їх введення у певні положення біологічно активних сполук часто призводить до покращення активності, селективності, метаболічної стійкості та інших фармакокінетичних та фармакодинаміч-

них характеристик речовин. З іншого боку, активне застосування флуороорганічних сполук пов'язано з тим, що за останні десятиліття було розроблено чимало ефективних методів введення Флуору та флуоровмісних замісників, запропоновано низку зручних і доступних реагентів та білдинг-блоків (Building Blocks), що значно спрощують методи синтезу різноманітних флуороорганічних сполук та дозволяють вводити флуоровані замісники в певне положення [2].

На відміну від інших флуоровмісних замісників, трифлуорометокси групу (CF_3O -) використовують не так часто, хоча фізико-хімічні та структурні властивості CF_3O -вмісних сполук є доволі привабливими, зокрема для застосування в розробці лікарських засобів [3]. Відомо лише кілька CF_3O -вмісних ароматичних сполук, що знайшли практичне застосування. Серед них препарат для лікування бічного аміотрофічного склерозу (БАС) Рилузол, регулятор зростання рослин Флупримідол, про-інсектицид Індоксакарб і регулятор зростання комах Трифлумурон (рис.).

Для синтезу CF_3O -вмісних сполук було розроблено декілька ефективних методів синтезу з використанням реагентів Рупперта-Пракаша [4], Тоні [5] та Умемото [6]. Проте, попри різні переваги та привабливість запропонованих методів, їх застосування часто є обмеженим та дорогим. Тому найбільш уживаним залишається класичний метод, запропонований групою Хіямі [7], – десульфуризація/флуорування ксантатів з використанням N-бромосукциніміду та реагенту Ола (піридин/HF). Водночас жорсткі умови проведення флуорування не дозволяють ефективно використовувати цей метод для введення CF_3O -групи на останніх стадіях синтезу складних органічних молекул (last stage modification) під час створення лікарських засобів. Альтернативою для «конструювання» більш складних молекул може бути використання доступних, простих за будовою CF_3O -вмісних реагентів та білдинг-блоків. Такий підхід, зокрема, активно застосовують для синтезу складних CF_3O -вмісних ароматичних сполук, оскільки чимало відповідних трифлуорометоксивмісних реагентів/білдинг-блоків є комерційно доступними. Разом з тим

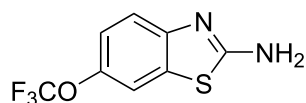
аліфатичні CF_3O -вмісні будівельні блоки є менш доступними і, як результат, їх значно рідше застосовують у медико-хімічних проєктах.

Продовжуючи наші попередні дослідження у сфері синтезу CF_3O -вмісних сполук [8, 9], у цій роботі ми репрезентуємо розробку мультиграмового синтезу 4-(трифлуорометокси)піперидину та 4-(трифлуорометоксиметил)піперидину – перспективних будівельних блоків для застосування в медичній хімії.

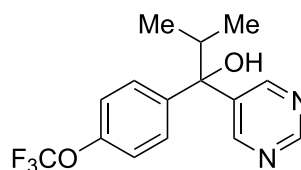
Результати та їх обговорення

Синтез трифлуорометоксивмісних аліфатичних амінів з відповідних аміноспиртів ускладнюється необхідністю захисту аміногрупи. При цьому захисна група має витримувати достатньо жорсткі умови флуорування за методом Хіямі і водночас її зняття не має призводити до руйнації CF_3O -групи. Раніше для синтезу трифлуорометоксивмісних вторинних циклічних амінів нами було використано тозильний захист [10], проте його застосування також не є ефективним: зняття тозильної групи вимагає достатньо жорстких умов (кип'ятіння з амальгамою натрію в метанолі), за яких відбувається часткова або повна руйнація CF_3O -групи. З цієї ж причини використання амідного захисту (ацетильний, бензоїльний) не є зручним: гідроліз відповідних амідів вимагає жорстких лужних умов, що призводить і до гідролізу CF_3O -групи.

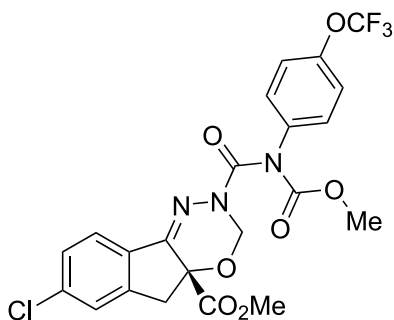
Також раніше повідомлялось про можливість застосування класичних Вос- та Сbz-захистів для проведення синтезу CF_3O -вмісних вторинних циклічних амінів [11, 12], проте наші намагання відтворити ці методики для синтезу амінів прийнятної



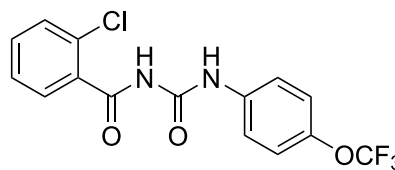
Рилузол



Флупримідол



Індоксакарб



Трифлумурон

Рис. CF_3O -вмісні сполуки, що знайшли застосування у фармацевтиці та агрохімії

чистоти не були успішними. Так, Вос-захист не витримує умов фторування, що значно ускладнює виділення цільових амінів. У випадку Cbz-захисту за умов проведення флуорування за методом Хіями відбувається також бромовання ароматичного кільця, яке ускладнює подальше зняття цього захисту навіть за жорстких умов.

Як альтернативний шлях до CF₃O-вмісних вторинних циклічних амінів **1** (схема 1) ми розглянули застосування N-бензоїльного захисту, зняття якого після флуорування запропонували проводити в дві стадії: відновленням N-бензоїльної групи до N-бензильної і подальшим використанням класичних методів дебензилювання. Зняття бензильного захисту не вимагає застосування жорстких лужних умов, і ми очікували отримати високі виходи цільових амінів **1a,b**, на синтезі яких було вирішено випробувати запропонований підхід.

Синтез аміну **1a** розпочинався з комерційно доступного 4-гідроксипіперидину (**2a**) (схема 2). Його бензоїлювання проводили з використанням бензоїлхлориду в присутності триетиламіну. Продукт ацилювання – N-бензоїл-4-гідроксипіперидин (**3a**) – було одержано з виходом 94% та перетворено на ксантат **4a** шляхом його взаємодії з сірковуглецем у присутності натрій гідриду з наступною взаємодією проміжної натрієвої солі з метилйодидом (вихід 90%). Одержаний ксантат **4a** було введено в реакцію флуорування за типових умов методу Хіями з утворенням CF₃O-вмісного амиду **5a** з виходом 90%, який було введено в наступну стадію без додаткового очищення. Далі нами було зроблено спробу зняти бензоїльний захист шляхом лужного гідролізу. Однак реакція відбувалась з руйнуванням CF₃O-групи. Єдиним виділеним продуктом був аміноспирт **2a**. Подібний результат також було отримано за умов кислотного гідролізу. З огляду на це, було застосовано іншу методологію видалення бензоїльної групи шляхом послідовних реакцій віднов-

лення та дебензилювання. Відновлення амідного фрагмента сполуки **5a** проводили з використанням літій алюмогідриду (вихід продукту **6a** склав 70%). Наступною реакцією було зняття бензильної групи. Гідрування сполуки **6a** з використанням 10% Pd/C не дало бажаних результатів. Навіть за гідрування під тиском 20 атм конверсія гідрогенолізу складала менше 10%. Кращі результати було досягнуто за використання 1-хлоретилхлороформіату [13]. Реакцію проводили в ди-хлороетані, і цільовий амін **1a** було одержано у вигляді гідрохлориду з виходом 76%. Розроблений метод дозволив одержати цільовий амін **1a** (гідрохлорид) у кількості 8,4 г із сумарним виходом 40% за 5 стадій (виходячи з 4-гідроксипіперидину).

Аналогічну схему було використано для синтезу 4-(трифлуорометоксиметил)піперидину (**1b**) (схема 3). У цьому випадку було одержано 12,9 г аміну **1b** (у вигляді гідрохлориду) із сумарним виходом 13,5% за 5 стадій (виходячи з 4-(гідроксиметил)піперидину (**2b**)).

Експериментальна частина

Розчинники було очищено за допомогою стандартних методів. У дослідженні використано вихідні речовини виробництва Acros, Merck, Fluka та НВП «Енамін». Спектри ¹H, ¹³C та ¹⁹F ЯМР одержано на спектрометрах Varian Unity Plus 400 (за 400 МГц для ¹H ЯМР та 376 МГц для ¹⁹F ЯМР) і Bruker 170 Avance 500 (за 500 МГц для ¹H ЯМР, 126 МГц для ¹³C ЯМР) за 25°C, хімічний зсув визначено в м.ч. відносно тетраметилсилану (¹H та ¹³C ЯМР) та трихлорофлуорометану (¹⁹F ЯМР), константу спінової взаємодії наведено у Гц, мультиплетність визначено як: с – синглет, д – дублет, т – триплет, кв – квартет, дд – дублет дублетів, м – мультиплет, уш. – уширений сигнал. Колонкову хроматографію застосовували з силікагелем 60 (Merck, розмір частинок 0,040–0,063 мм). Чистоту сполук контро-

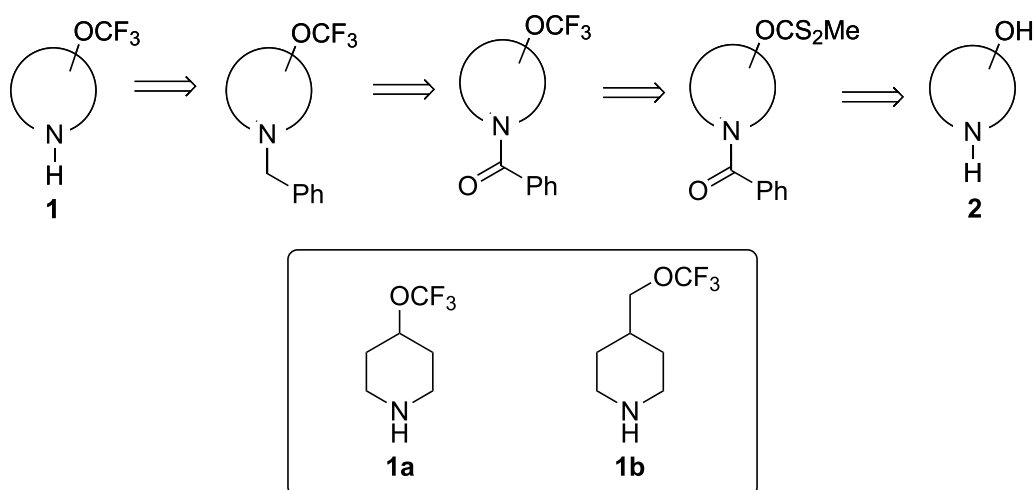


Схема 1. Загальна ретросинтетична схема синтезу циклічних CF₃O-вмісних амінів **1** та структури цільових сполук **1a,b**

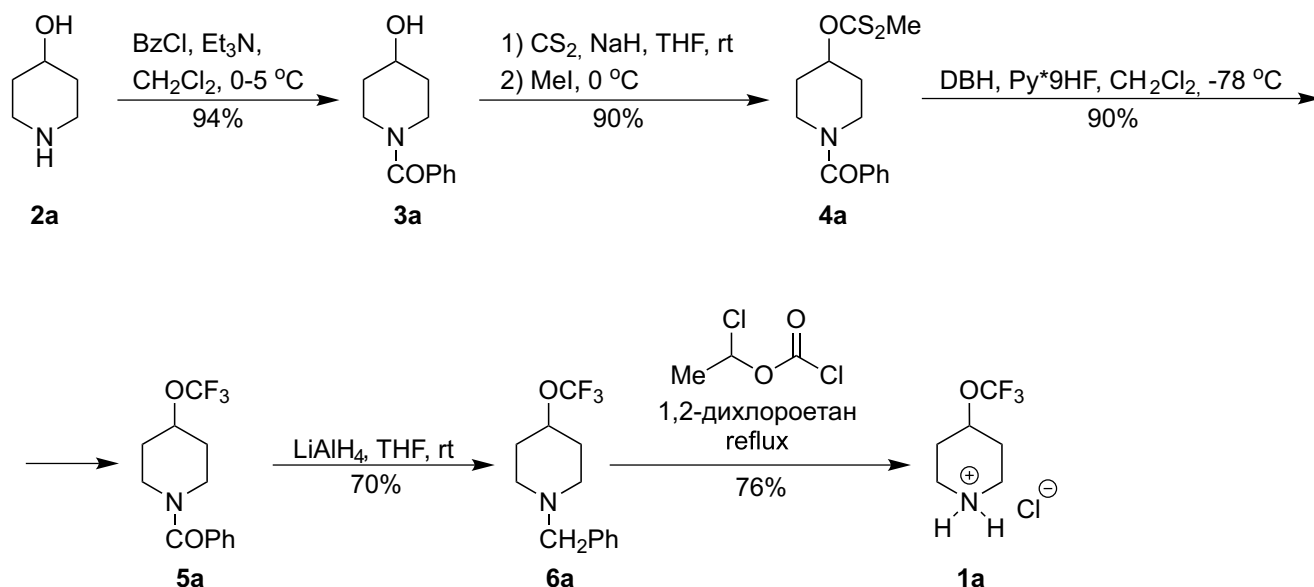


Схема 2. Синтез 4-(трифлуорометокси)піперидиній хлориду (1a)

лювали за допомогою ТШХ (silica gel 60 F254, Merck). Елементний аналіз виконано в лабораторії органічного аналізу хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка за допомогою приладу Vario MICRO Cube CHNS/O analyzer. Мас-спектри було записано на приладі Agilent 1100 LCMSD SL (хімічна іонізація (CI)).

Синтез N-бензоїл 4-гідроксіпіперидину (3a). Розчин бензоїлхлориду (69,5 г; 0,50 моль) у дихлорометані (100 мл) додають по краплям до розчину 4-гідроксіпіперидину (2a) (50,0 г; 0,50 моль) та триетиламіну (70 мл; 0,50 моль) в 500 мл дихлорометану за температури 0–5 °C. Одержану суміш перемішують за кімнатної температури протягом ночі, потім промивають водою (2 × 200 мл) та насиченим розчином солі (200 мл), сушать над безводним натрій сульфатом та концентрують за

зниженого тиску. Одержану сполуку 3a використовують у наступній стадії без додаткового очищення.

Тверда біла речовина. Вихід – 96,0 г (94%). Т. пл. 86–87 °C (*lit.* Т. пл. 89–90 °C [14]). Розраховано для C₁₂H₁₅NO₂, %: C 70,22; H 7,37; N 6,82. Визначено, %: C 70,13; H 7,45; N 6,69. Спектральні дані сполуки 3a ідентичні описаним у літературі [14]. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 1,40–1,75 (2H, м); 1,77–2,07 (2H, м); 2,68 (1H, уш. с.); 3,13–3,44 (2H, м); 3,59–3,75 (1H, м); 3,93–4,01 (1H, м); 4,13–4,29 (1H, м); 7,37–7,43 (5H, м). MS (CI), m/z: 206,2 [M+H]⁺.

Синтез O-(1-бензоїлпіперидин-4-іл)-S-метилкарбонотитіоату (4a). Суспензію натрій гідриду (60% у мінеральній олії, 37,4 г; 0,94 моль) у сухому ТГФ (800 мл) в колбі, що оснащена магнітним змішувачем, рахівником бульбашок, термометром та крапельною воронкою, охолоджують

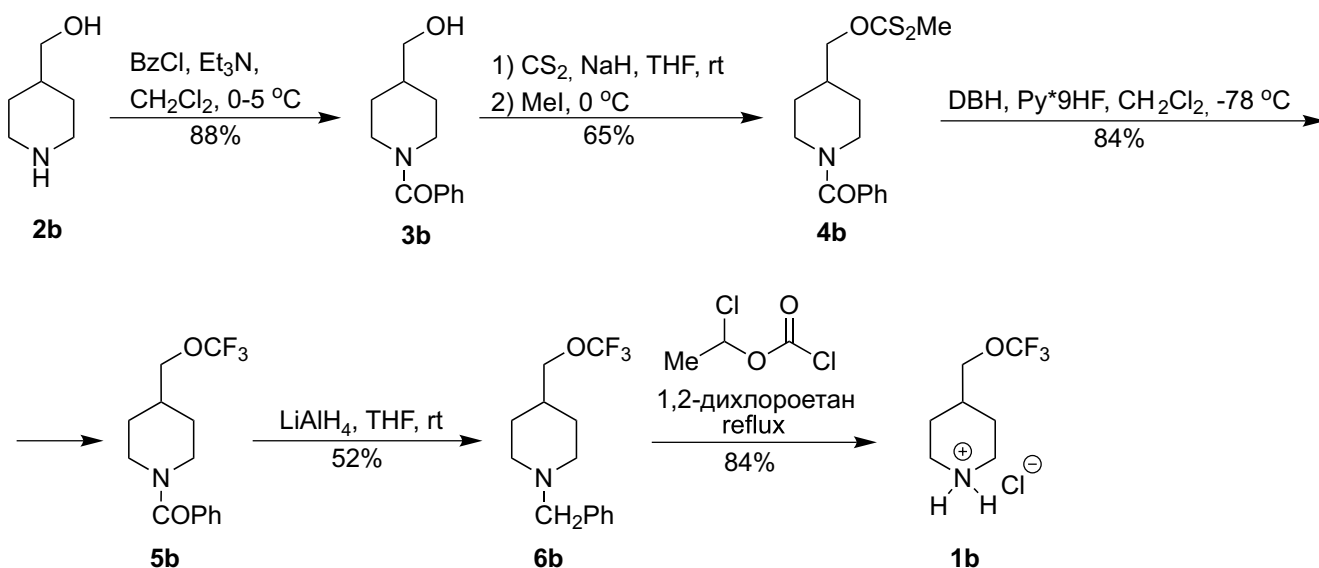


Схема 3. Синтез 4-(трифлуорометоксиметил)піперидиній хлориду (1b)

до 10–15°C. Сполуку **3a** (96,0 г; 0,47 моль) у ТГФ (500 мл) додають по краплям до суспензії натрій гідриду за інтенсивного перемішування та за температури не вище 25°C. Виділення водню контролюють за допомогою рахівника бульбашок. Після закінчення додавання реакційну суміш залишають перемішуватися за кімнатної температури ще на 5 годин. Потім суміш охолоджують до 0°C та за перемішування додають по краплям розчин сірководню (106,9 г; 1,40 моль) у ТГФ (250 мл). Суміш залишають перемішуватися за кімнатної температури протягом ночі, далі охолоджують до 0°C та по краплям додають метилйодид (119,6 г; 0,84 моль). Після цього реакційну суміш залишають за кімнатної температури ще на 2 години, охолоджують до 0°C, по краплям обережно додають воду (100 мл) та концентрують за зниженого тиску. Одержаний осад розчиняють в етилацетаті (1 л), промивають водою (200 мл), насиченим розчином солі (200 мл), сушать над безводним натрій сульфатом, фільтрують та концентрують за зниженого тиску. Залишок очищують за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (гексан/ЕтОАс, 8:2, $R_f = 0,25$), одержуючи сполуку **4a**.

Тверда жовтувата речовина. Вихід – 125,1 г (90%). Т. пл. 47–48°C. Розраховано для $C_{14}H_{17}NO_2S_2$, %: С 56,92; Н 5,80; N 4,74. Визначено, %: С 57,04; Н 5,69; N 4,81. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,74–2,17 (4H, м); 2,55 (3H, с); 3,26–4,04 (4H, м); 5,72–5,87 (1H, м); 7,31–7,54 (5H, м). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 19,0; 30,5; 44,6; 78,2; 126,8; 128,5; 129,7; 135,8; 170,5; 215,0. MS (CI), m/z: 296,2 [M+H]⁺.

Синтез N-бензоїл 4-трифлуорометоксипіперидину (5a). Суміш 1,3-дібром-5,5-диметилгідантоїну (209,0 г; 0,73 моль) у дихлорометані (1 л) охолоджують до –78°C у 2-х літровому тefлоновому реакторі, який оснащено верхньоповідним змішувачем та рахівником бульбашок, за продування аргоном. Далі по краплям додають піридин*9HF (реагент Ола, 174 мл) та розчин сполуки **4a** (75,3 г; 0,24 моль) у дихлорометані (125 мл). Реакційну суміш залишають за кімнатної температури на 3 години. Потім суміш виливають у воду з льодом (1 л), відокремлюють органічний шар та екстрагують водну частину дихлорометаном (2 × 150 мл). Органічні шари об'єднують, промивають холодним (5°C) 37% розчином натрій бісульфіту (400 мл), водою (400 мл), сушать над безводним натрій сульфатом та фільтрують через шар силікагелю. Після упарювання у вакуумі одержують неочищений продукт **5a**, який використовують у наступній стадії без додаткового очищення.

Жовта олія. Вихід – 62,5 г (90%). Розраховано для $C_{13}H_{14}F_3NO_2$, %: С 57,14; Н 5,16; N 5,13. Визначено, %: С 57,01; Н 5,28; N 5,27. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,60–2,14 (4H, м); 3,21–4,08 (4H, м);

4,44–4,56 (1H, м); 7,31–7,46 (5H, м). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 31,5; 44,0; 73,8 (кв, $J = 2,5$ Гц); 121,6 (кв, $J = 254,0$ Гц); 126,8; 128,5; 129,8; 135,6; 170,5. ^{19}F ЯМР (376 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: –58,56 (с). MS (CI), m/z: 274,2 [M+H]⁺.

Синтез N-бензил-4-трифлуорометоксипіперидину (6a). До суспензії літій алюмогідриду (8,3 г; 0,22 моль) у сухому ТГФ (500 мл) за 0°C додають розчин сполуки **5a** (32,0 г; 0,12 моль) у ТГФ (100 мл) та залишають суміш за інтенсивного перемішування за кімнатної температури протягом ночі. Потім суміш охолоджують та до неї по краплям додають воду (5 мл), потім 15% розчин натрій гідроксиду (7 мл) та знову воду (5 мл) за 0°C. Одержану суміш екстрагують етилацетатом (3 × 250 мл), фільтрують через шар силікагелю, промивають етилацетатом та упарюють. Залишок очищують за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (гексан/ЕтОАс, 7:3, $R_f = 0,35$) та одержують сполуку **6a**.

Жовта олія. Вихід – 16,2 г (52%). Розраховано для $C_{13}H_{16}F_3NO$, %: С 60,22; Н 6,22; N 5,40. Визначено, %: С 60,06; Н 6,13; N 5,54. 1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,76–1,88 (2H, м); 1,89–1,99 (2H, м); 2,19–2,31 (2H, м); 2,66–2,75 (2H, м); 3,49 (2H, с, CH_2); 4,19–4,31 (1H, м); 7,20–7,37 (5H, м). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 31,6; 50,2; 60,4; 62,8; 121,7 (кв, $J = 254,0$ Гц); 127,1; 128,2; 129,0; 138,2. ^{19}F ЯМР (376 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: –58,25 (с). MS (CI), m/z: 260,2 [M+H]⁺.

Синтез 4-(трифлуорометокси)піперидиній хлориду (1a). Речовину **6a** (13,8 г; 41 ммоль) в 1,2-дихлороетані (200 мл) охолоджують до 0°C. Поступово додають розчин 1-хлороетилхлороформіату (10,9 г; 76 ммоль) в 1,2-дихлороетані (20 мл) і перемішують протягом 15 хвилин за 0°C. Після цього реакційну суміш кип'ятять за перемішування протягом ночі, після чого її охолоджують та упарюють у вакуумі. Осад, що утворився, розчиняють у метанолі і кип'ятять протягом 2 годин, охолоджують, а розчинник упарюють. Залишок затирають у діетиловому етері та одержують сполуку **1a** у вигляді гідрохлориду, яку кристалізують з ацетонітрилу.

Безбарвна тверда речовина. Вихід – 8,4 г (76%). Т. пл. 170–172°C (MeCN). Розраховано для $C_6H_{11}ClF_3NO$, %: С 35,05; Н 5,39; N 6,81. Визначено, %: С 35,14; Н 5,46; N 6,78. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$), δ , м.ч.: 1,85–1,98 (2H, м); 2,04–2,18 (2H, м); 3,09–3,24 (4H, м); 4,65–4,80 (1H, м); 9,22 (2H, с). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $DMSO-d_6$), δ , м.ч.: 28,2; 40,5; 73,0 (кв, $J = 1,9$ Гц); 121,6 (кв, $J = 254,0$ Гц). ^{19}F ЯМР (376 МГц, $DMSO-d_6$), δ , м.ч.: –56,97 (с). MS (CI) m/z: 170,1 [M+H]⁺.

Синтез N-бензоїл 4-(гідроксиметил)піперидину (3b). Сполуку **3b** було одержано за вищеприписаною методикою для синтезу сполуки **3a**,

виходячи зі сполуки **2b** (69,1 г; 0,6 моль), бензоїлхлориду (84,4 г; 0,6 моль) та триетиламіну (84,0 мл; 1,2 моль).

Тверда біла речовина. Вихід – 115,8 г (88%). Т. пл. 81–83°C (*lit.* Т. пл. 83–85°C [15]). Розраховано для $C_{13}H_{17}NO_2$, %: С 71,21; Н 7,81; N 6,39. Визначено, %: С 71,14; Н 7,96; N 6,28. Спектральні дані сполуки **3b** ідентичні описаним у літературі [15]. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,07–1,40 (2H, м); 1,56–1,98 (3H, м); 2,64–3,07 (2H, м); 3,52 (2H, д, $J = 5,9$ Гц); 3,69–3,88 (1H, м); 4,60–4,84 (1H, м); 7,30–7,46 (5H, м). MS (CI), m/z : 219,2 [M+H]⁺.

Синтез O-((1-бензоїлпіперидин-4-іл)метил)-S-метилкарбондитіолату (4b). Сполуку **4b** було одержано за вищеописаною методикою для синтезу сполуки **4a**, виходячи зі сполуки **3b** (109,7 г; 0,5 моль), натрій гідриду (60% у мінеральній олії, 40,0 г; 1,0 моль), сірковуглецю (114,2 г; 1,5 моль) та метилйодиду (127,8 г; 0,9 моль). Очищують сполуку **4b** за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (гексан/EtOAc, 8:2, $R_f = 0,28$).

Жовта олія. Вихід – 101,3 г (65%). Розраховано для $C_{15}H_{19}NO_2S_2$, %: С 58,22; Н 6,19; N 4,53. Визначено, %: С 58,30; Н 6,11; N 4,68. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,15–1,47 (2H, м); 1,66–1,96 (2H, м); 2,06–2,20 (1H, м); 2,54 (3H, с); 2,71–3,07 (2H, с); 3,69–3,87 (1H, м); 4,47 (2H, д, $J = 6,5$ Гц); 4,63–4,84 (1H, м); 7,33–7,43 (5H, м). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 18,6; 28,7; 35,2; 47,0; 76,7; 126,3; 128,0; 129,1; 169,9; 215,6; 135,7. MS (CI), m/z : 310,0 [M+H]⁺.

Синтез N-бензоїл-4-(трифлуорометоксиметил)піперидину (5b). Сполуку **5b** було одержано за вищеописаною методикою для синтезу сполуки **5a**, виходячи зі сполуки **4b** (80,5 г; 0,26 моль), 1,3-дибromo-5,5-диметилгідантоїну (223,0 г; 0,78 моль) та піридин*9HF (186 мл).

Жовта олія. Вихід – 63 г (84%). Розраховано для $C_{14}H_{16}F_3NO_2$, %: С 58,53; Н 5,61; N 4,88. Визначено, %: С 58,39; Н 5,73; N 4,82. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,08–1,42 (2H, м); 1,60–1,89 (2H, м); 1,89–2,02 (1H, м); 2,64–3,10 (2H, м); 3,81 (2H, д,

$J = 6,4$ Гц); 4,61–4,86 (1H, м); 7,29–7,46 (5H, м). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 28,4; 35,3; 46,8; 70,4 (кв, $J = 2,8$ Гц); 121,2 (кв, $J = 254,0$ Гц); 126,4; 128,0; 129,1; 135,6; 169,9. ^{19}F ЯМР (376 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: –61,40 (с). MS (CI), m/z : 288,1 [M+H]⁺.

Синтез N-бензил (4-трифлуорометоксиметил)піперидину (6b). Сполуку **6b** було одержано за вищеописаною методикою для синтезу сполуки **6a**, виходячи зі сполуки **5b** (45,6 г; 0,16 моль) та $LiAlH_4$ (6,0 г; 0,16 моль). Цільову похідну очищували за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі (гексан/EtOAc, 7:3, $R_f = 0,39$).

Жовта олія. Вихід – 22,8 г (52%). Розраховано для $C_{14}H_{18}F_3NO$, %: С 61,53; Н 6,64; N 5,13. Визначено, %: С 61,62; Н 6,55; N 5,04. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 1,19–1,45 (2H, м); 1,62–1,77 (3H, м); 1,91–2,01 (2H, м); 2,85–2,93 (2H, м); 3,48 (с, 2H); 3,78 (2H, д, $J = 6,0$ Гц); 7,22–7,39 (5H, м). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: 28,5; 35,4; 53,0; 63,3; 71,7 (кв, $J = 2,8$ Гц); 121,7 (кв, $J = 254,0$ Гц); 126,9; 128,1; 129,1; 138,4. ^{19}F ЯМР (376 МГц, $CDCl_3$), δ , м.ч.: –61,24 (с). MS (CI), m/z : 274,2 [M+H]⁺.

Синтез 4-(трифлуорометоксиметил)піперидиний хлориду (1b). Сполуку **1b** було одержано за вищеописаною методикою для синтезу сполуки **1a**, виходячи зі сполуки **6b** (19,0 г; 70 ммоль) та 1-хлороетилхлороформіату (13,3 г; 93 ммоль). Сполуку **1b** одержують у вигляді гідрохлориду та кристалізують з ацетонітрилу.

Безбарвна тверда речовина. Вихід – 12,9 г (84%). Т. пл. 146–148°C (MeCN). Розраховано для $C_7H_{13}ClF_3NO$, %: С 38,28; Н 5,97; N 6,38. Визначено, %: С 38,15; Н 5,86; N 6,44. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$), δ , м.ч.: 1,39–1,53 (2H, м); 1,74–1,83 (2H, м); 1,92–2,02 (1H, м); 2,77–2,90 (2H, м); 3,18–3,27 (2H, м); 3,96 (2H, д, $J = 6,2$ Гц); 8,92 (1H, с); 9,26 (1H, с). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $DMSO-d_6$), δ , м.ч.: 24,81; 32,97; 42,73; 71,6 (кв, $J = 2,4$ Гц); 121,8 (кв, $J = 254,0$ Гц). ^{19}F ЯМР (376 МГц, $DMSO-d_6$), δ , м.ч.: –59,36 (с). MS (CI), m/z : 184,1 [M+H]⁺.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

- Haufe, G.; Leroux, F. R., Eds. *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*; Progress in Fluorine Science Series; Academic Press: San Diego, 2019; Vol. 4.
- Kirsch, P. *Modern Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, Reactivity, Applications*, 2nd Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2013.
- Gregory, L.; Armen, P.; Frederic, R. L. Trifluoromethyl Ethers and -Thioethers as Tools for Medicinal Chemistry and Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14* (7), 941–951. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026614666140202210016>.
- Liu, J.-B.; Xu, X.-H.; Qing, F.-L. Silver-Mediated Oxidative Trifluoromethylation of Alcohols to Alkyl Trifluoromethyl Ethers. *Org. Lett.* **2015**, *17* (20), 5048–5051. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02522>.
- Koller, R.; Stanek, K.; Stolz, D.; Aardoom, R.; Niedermann, K.; Togni, A. Zinc-Mediated Formation of Trifluoromethyl Ethers from Alcohols and Hypervalent Iodine Trifluoromethylation Reagents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (24), 4332–4336. <https://doi.org/10.1002/anie.200900974>.
- Umamoto, T.; Adachi, K.; Ishihara, S. CF_3 Oxonium Salts, O-(Trifluoromethyl)dibenzofuranium Salts: In Situ Synthesis, Properties, and Application as a Real CF_3^+ Species Reagent. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (18), 6905–6917. <https://doi.org/10.1021/jo070896r>.
- Shimizu, M.; Hiyama, T. Modern Synthetic Methods for Fluorine-Substituted Target Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (2), 214–231. <https://doi.org/10.1002/anie.200460441>.
- Kondratov, I. S.; Logvinenko, I. G.; Tolmachova, N. A.; Morev, R. N.; Kliachyna, M. A.; Clausen, F.; Daniliuc, C. G.; Haufe, G. Synthesis and physical chemical properties of 2-amino-4-(trifluoromethoxy)butanoic acid – a CF_3O -containing analogue of natural lipophilic amino acids. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (3), 672–679. <https://doi.org/10.1039/C6OB02436j>.

9. Logvinenko, I. G.; Markushyna, Y.; Kondratov, I. S.; Vashchenko, B. V.; Kliachyna, M.; Tokaryeva, Y.; Pivnytska, V.; Grygorenko, O. O.; Haufe, G. Synthesis, physico-chemical properties and microsomal stability of compounds bearing aliphatic trifluoromethoxy group. *J. Fluorine Chem.* **2020**, *231*, 109461. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2020.109461>.
10. Логвиненко, І. Г.; Кондратов, І. С. Синтез, фізико-хімічні властивості та мікросомальна стабільність аліфатичних трифторометокси-вмісних сполук. В *Біоактивні сполуки, нові речовини і матеріали*; Вовк, А. І., Ред.; За матеріалами XXXV Наукової конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії (23 квітня 2020 р., м. Київ); Інтерсервіс: Київ, 2020; с 125–129.
11. Bryan, M. C.; Chan B.; Hanan E.; Heffron T.; Purkey H.; Elliott R. L.; Heald R.; Knight J.; Lainchbury M.; Seward E. M. Aminopyrimidine compounds as inhibitors of T760M containing EGFR mutants. International patent WO2014081718, May 30, 2014.
12. Chen, H. S.; Chu, Y.; Do, S.; Estrada, A.; Hu, B.; Kolesnikov, A.; Lin, X.; Lyssikatos, J. P.; Shore, D.; Verma, V.; Wang, L.; Wu, G.; Yuen, P.-W. Substituted heterocyclic sulfonamide compounds useful as TRPA1 modulators. International Patent WO2015052264, April 16, 2015.
13. Yang, B. V.; O'Rourke, D.; Li, J. Mild and Selective Debenzylation of Tertiary Amines Using α -Chloroethyl Chloroformate. *Synlett* **1993**, *1993* (03), 195–196. <https://doi.org/10.1055/s-1993-22398>.
14. Chang, D.; Feiten, H.-J.; Engesser, K.-H.; van Beilen, J. B.; Witholt, B.; Li, Z. Practical Syntheses of N-Substituted 3-Hydroxyazetidines and 4-Hydroxypiperidines by Hydroxylation with Sphingomonas sp. HXN-200. *Org. Lett.* **2002**, *4* (11), 1859–1862. <https://doi.org/10.1021/ol025829s>.
15. Barbe, G.; Charette, A. B. Highly Chemoselective Metal-Free Reduction of Tertiary Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (1), 18–19. <https://doi.org/10.1021/ja077463q>.

Received: 03. 01. 2021

Revised: 27. 01. 2021

Accepted: 05. 02. 2021

Г. Г. Яковенко^{1,2}, М. В. Вовк²¹ Національний університет «Києво-Могилянська академія», Україна
04655, м. Київ, вул. Григорія Сковороди, 2. E-mail: chemgeorge@i.ua² Інститут органічної хімії НАН України, Україна

Зручні підходи до синтезу 6-аміно- та 6-оксоімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів

Мета роботи. Розробити препаративно зручний варіант синтезу 6-аміно- та 6-оксоімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів як нових молекулярних платформ для дизайну біоперспективних сполук.

Результати та їх обговорення. З'ясовано, що циклоконденсація *N*-Boc-4-амінопіразол-5-карбальдегідів із креатиніном може бути використана як ефективний метод одержання раніше не відомих 6-аміноімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів. Для синтезу їх 6-оксоаналогів вдалим виявився модифікований варіант перегрупування Курціуса 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонових кислот із дифенілфосфорилазидом, який було реалізовано через ключову стадію відповідних аміноізоціанатів.

Експериментальна частина. Взаємодією *N*-Boc-4-амінопіразол-5-карбальдегідів із креатиніном у киплячій оцтовій кислоті в присутності піролідину як каталізатора синтезовано 6-аміноімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридини з виходами 54–70%. Їхню будову надійно доведено спектральними вимірюваннями. Зокрема, у спектрах ¹H ЯМР наявні синглети протонів H-3 (7,63–7,88 м.ч) та H-8 (7,87–8,26 м.ч.), а також уширені синглети групи NH₂ в діапазоні 7,05–7,21 м.ч. 5-Амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонові кислоти реагують із дифенілфосфорилазидом за нагрівання 6 год у діоксані в присутності триетиламіну з утворенням 1-заміщених імідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридин-6(5*H*)-онів із виходами 67–80%. ІЧ-спектри синтезованих сполук характеризуються смугами поглинання груп C=O (1705–1708 см⁻¹) та NH (3275–3281 см⁻¹), а ¹H ЯМР-спектри – синглетами протонів H-3 та H-8 відповідно в інтервалах 7,43–8,08 м.ч. і 7,92–8,32 м.ч. та двома широкими синглетами NH-протонів у діапазонах 10,90–11,12 м.ч. і 11,25–11,37 м.ч.

Висновки. Розроблено ефективні підходи до одержання нових біопривабливих молекулярних платформ – 6-аміно- та 6-оксоімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів, які ґрунтуються на циклоконденсаціях *N*-Boc-4-амінопіразол-5-карбальдегідів із креатиніном та 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонових кислот із дифенілфосфорилазидом.

Ключові слова: *N*-Boc-4-амінопіразол-5-карбальдегіди; креатинін; 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонові кислоти; дифенілфосфорилазид; 6-аміно(оксо)імідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридини; циклоконденсація

G. G. Yakovenko^{1,2}, M. V. Vovk²¹National University of Kyiv-Mohyla Academy, Ukraine²Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine

Convenient approaches to the synthesis of 6-amino- and 6-oxoimidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridines

Aim. To develop convenient approaches to the synthesis of 6-amino- and 6-oxoimidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridines as promising biologically active scaffolds.

Results and discussion. It has been found that cyclocondensation of *N*-Boc-4-aminopyrazole-5-carbaldehydes with creatinine can be used as an effective method for obtaining 6-aminoimidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridines previously unknown. For the synthesis of their 6-oxoanalogs, the reaction of 5-aminopyrazolo[4,3-*b*]pyridine-6-carboxylic acids used in a modified Curtius rearrangement with diphenylphosphorylazide was successful. This method was implemented through the stage of the intermediate aminoisocyanates formation.

Experimental part. The reaction of *N*-Boc-4-aminopyrazole-5-carbaldehydes with creatinine in the presence of pyrrolidine as a catalyst in refluxing acetic acid allowed to obtain 6-aminoimidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridines with the yields of 54–70%. The structure of the compounds synthesized was proven by spectral measurements. In the ¹H NMR spectra there were singlets of H-3 (7.63–7.88 ppm) and H-8 (7.87–8.26 ppm) protons, as well as broad singlets of the NH₂ group in the range of 7.05–7.21 ppm. Heating of 5-aminopyrazolo[4,3-*b*]pyridine-6-carboxylic acids with triethylamine and diphenylphosphorylazide in dioxane for 6 hours gave 1-substituted imidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridine-6(5*H*)-ones with the yields of 67–80%. The IR-spectra of the compounds synthesized were characterized by the absorption bands of the C=O (1705–1708 cm⁻¹) and NH (3275–3281 cm⁻¹) groups. ¹H NMR-spectra were characterized by singlets of H-3 and H-8 protons in the intervals of 7.43–8.08 ppm and 7.92–8.32 ppm respectively, as well as by two broad singlets of NH-protons in the ranges of 10.90–11.12 ppm and 11.25–11.37 ppm.

Conclusions. Effective approaches to the synthesis of new promising heterocyclic systems of 6-amino- and 6-oxoimidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridines have been developed. Cyclocondensations of *N*-Boc-4-aminopyrazole-5-carbaldehydes with creatinine and 5-aminopyrazolo[4,3-*b*]pyridine-6-carboxylic acids with diphenylphosphorylazide have been proven to be convenient ways to obtain these compounds with good yields.

Key words: *N*-Boc-4-aminopyrazole-5-carbaldehyde; creatinine; 5-aminopyrazolo[4,3-*b*]pyridine-6-carboxylic acid; diphenylphosphorylazide; 6-amino(oxo)imidazo[4,5-*b*]pyrazolo[3,4-*e*]pyridines; cyclocondensation

Молекулярний скелет імідазо[4,5-*b*]піридину є ізостерним до пурину і характеризується широким спектром фармакологічної дії. Серед низки його похідних виявлено антагоністи рецептора ангіотензину II [1], тромбоксан A₂ простагландинового H₂ рецептора [2], інгібітори гідролази лейкотриєну A₄ [3], специфічної серин\треонін протеїнкінази [4, 5] та дипептидилпептинази [6]. При цьому також варто звернути увагу і на наявність мутагенних властивостей у деяких 2-аміноімідазо[4,5-*b*]піридинів [7, 8] та їх конденсованих похідних [9, 10], які можуть утворюватися в процесі термічного оброблення м'яса і риби.

Конденсованим за піридиновим ядром імідазо[4,5-*b*]піридинового скафолду сполукам також притаманна біологічна дія. Зокрема, похідні імідазо[4,5-*b*]хіноліну [11-14] та імідазо[4,5-*h*][1,6]нафтиридину [15] відомі як інгібітори циклічного аденозинмонофосфату тромбоцитів крові.

Предметом нашого дослідження стали нові аміно-та оксофункціоналізовані імідазо[4,5-*b*]піридини з анельованим за піридиновим ядром фармакофорним піразольним циклом [16–19]. Інформація про них у літературі є вкрай обмеженою і стосується похідних імідазо[4,5-*b*]піразоло[4,3-*e*]піридин-6-ону, одержаних трикомпонентною циклоконденсацією 4-іміноімідазолідону з ароматичними альдегідами і 5-амінопіразолами [20], а також 7-рибофуранозилімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридину, отриманого добудовою піразольного циклу до відповідного N-[(рибофуранозил)імідазо[4,5-*b*]піридин-6-іл]ацетаміду [21].

Зазвичай для одержання 2-аміноімідазо[4,5-*b*]піридинів використовують варіанти, які передбачають формування аміноімідазольного циклу на базі відповідних 1,2-діамінопіридинів [22–25], а також функціоналізацію імідазольного ядра імідазо[4,5-*b*]піридинів [26–28]. Своєю чергою, для синтезу 2-оксоімідазо[4,5-*b*]піридинів запропоновано декілька методів, які охоплюють взаємодію 1,2-діамінопіридинів з моноцентровими карбонільними електрофілами [6, 26, 29–31], а також внутрішньомолекулярні реакції перегруповання Курціуса 2-амінонікотинових кислот [26, 32, 33] та Гофмана амідів 2-амінонікотинових кислот [34–39].

Для конструювання біопривабливих похідних імідазо[4,5-*b*]хінолін-2-онів вдалою виявилась конденсація Хорнера-Вадсворта-Еммонса 2-нітробензальдегідів із діоксоімідазолідин-5-фосфонатами [11-13, 40], у якій ключовою стадією є анелювання хінолінового циклу. Автори праці [10] описали синтез 2-аміноімідазо[4,5-*b*]тієно[2,3-*e*]піридину реакцією Фрідлендера 3-аміно-5-метил-2-тіофенкарбальдегіду із креатиніном (2-аміно-1-метил-5*H*-імідазол-4-он) у присутності *N,O*-біс(триметилсиліл)ацетаміду (BSA) як розчинника та конденсуючого реагенту. З метою отримання їх піразоловмісних аналогів видавалося доцільним апро-

бувати в подібній конденсації із креатиніном раніше синтезовані нами *N*-Вос-4-амінопіразол-5-карбальдегіди **1a–d** [41].

Нами з'ясовано, що така реакція не вимагає спеціальних умов проведення (використання BSA) і селективно перебігає за кип'ятіння альдегідів **1a–d** із креатиніном (**2**) в льодяній оцтовій кислоті у присутності еквімолярної кількості піролідину з утворенням 6-аміноімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів **3a–d** з виходами 54–70%. При цьому для альдегідів **1a,b** вона завершується впродовж 4 год, а для альдегідів **1c,d** зі стерично утрудненими замісниками R час її перебігу зростає відповідно до 5–6 год. Найвірогідніше, що таке перетворення реалізується через стадію первинної конденсації формільної функції сполук **1a–d** із метиленактивним фрагментом креатиніну (**2**) з утворенням іліденових інтермедіатів **A**. Їх подальша внутрішньомолекулярна циклізація за рахунок взаємодії згенерованої в умовах реакції піразольної аміногрупи з карбонільною імідазольною групою призводить до цільових структур **3a–d** (табл. 1, 2, схема 1).

Будову синтезованих трициклічних сполук **3a–d** надійно доведено за допомогою спектральних вимірювань. Зокрема, у спектрах ¹H ЯМР наявні синглети протонів Н-3 (7,63–7,88 м.ч) та Н-8 (7,87–8,26 м.ч.), а також широкі синглети групи NH₂ у діапазоні 7,05–7,21 м.ч.

Використання в наведеній вище реакції із *N*-Вос-4-амінопіразол-5-карбальдегідами **1a–d** гідантоїну замість креатиніну з метою одержання відповідних 6-оксопохідних не виявилось успішним; із реакційної суміші було виділено вихідні реагенти та продукти поліконденсації. Позитивних результатів не було отримано і в разі введення нещодавно описаних нами [42] 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбоксамідів **4a–d** в реакцію Гофмана із використанням йодобензендіацетату як окисника [37–39]. Тому амідів **4a–d** лужним гідролізом було перетворено з виходами 89–96% на 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонові кислоти **5a–d** (табл. 1, 2). Їх подальше перетворення в умовах модифікованої реакції Курціуса із використанням такого ефективного азидувального реагенту, як дифенілфосфорилазид, за нагрівання в діоксані протягом 6 год у присутності триетиламіну через стадії проміжних аміноацилазидів **A** та аміноізоціанатів **B** призвело до утворення 1-заміщених імідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридин-6(5*H*)-онів **6a–d** із виходами 67–80% (табл. 1, 2, схема 2).

ІЧ-спектри сполук **6a–d** характеризуються смугами поглинання груп C=O (1705–1708 см⁻¹) та NH (3275–3281 см⁻¹), а ¹H ЯМР-спектри – синглетами протонів Н-3 та Н-8 відповідно в інтервалах 7,43–8,08 м.ч. і 7,92–8,32 м.ч. та двома широкими синглетами NH-протонів у діапазонах 10,90–11,12 м.ч. і 11,25–11,37 м.ч.

Таблиця 1

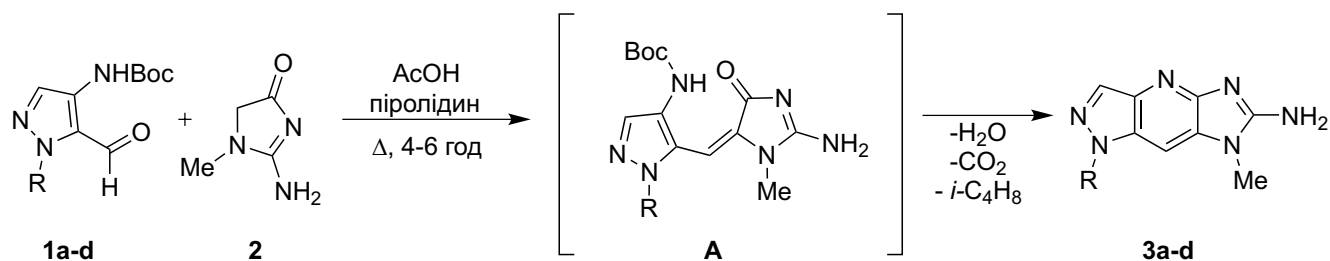
Виходи, температури плавлення, мас-спектри та результати елементного аналізу сполук **3a–d**, **5a–d**, **6a–d**

Сполука	Вихід,%	Т. пл., °C	[M+H] ⁺	Розраховано,%			Формула	Визначено,%		
				C	H	N		C	H	N
3a	58	276–278	203	53,46	4,98	41,56	C ₉ H ₁₀ N ₆	53,59	5,08	41,71
3b	70	268–271	217	55,54	5,59	38,86	C ₁₀ H ₁₂ N ₆	55,60	5,46	38,79
3c	57	262–264	245	59,00	6,60	34,40	C ₁₂ H ₁₆ N ₆	58,77	6,53	34,23
3d	54	280–283	265	63,62	4,58	31,80	C ₁₄ H ₁₂ N ₆	63,78	4,71	31,97
5a	94	>300	193	50,00	4,20	29,15	C ₈ H ₈ N ₆ O ₂	50,14	4,13	29,19
5b	96	>300	207	52,42	4,89	27,17	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂	52,59	4,95	27,04
5c	89	>300	235	56,40	6,02	23,92	C ₁₁ H ₁₄ N ₄ O ₂	56,27	5,89	23,98
5d	91	>300	255	61,41	3,96	22,04	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₂	61,57	3,88	21,87
6a	80	>300	190	50,79	3,73	37,02	C ₈ H ₇ N ₅ O	50,71	3,70	37,10
6b	73	>300	204	53,20	4,46	34,47	C ₉ H ₉ N ₅ O	53,27	4,53	34,31
6c	67	>300	232	57,13	5,67	30,28	C ₁₁ H ₁₃ N ₅ O	57,28	5,60	30,44
6d	69	>300	252	62,15	3,61	27,87	C ₁₃ H ₉ N ₅ O	62,31	3,49	28,97

Таблиця 2

Дані ІЧ-, ¹H та ¹³C ЯМР-спектрів сполук **3a–d**, **5a–d**, **6a–d**

Сполука	ІЧ (KBr), ν, см ⁻¹	Спектри ¹ H ЯМР (399,97 МГц, DMSO-d ₆) та ¹³ C ЯМР (125,75 МГц, DMSO-d ₆), δ, м.ч.
3a	1667 (C=N) 3371, 3115 (NH ₂)	¹ H: 3,55 (3H, c, N-CH ₃); 4,01 (3H, c, N-CH ₃); 7,05 (2H, уш. c, NH ₂); 7,63 (1H, c, H-3); 7,89 (1H, c, H-8) ¹³ C: 28,9; 36,1; 94,2; 129,5; 130,2; 131,3; 136,3; 155,9; 159,9
3b	1665 (C=N) 3368, 3128 (NH ₂)	¹ H: 1,39 (3H, т, J = 7,0 Гц, CH ₂ CH ₃); 3,56 (3H, c, N-CH ₃); 4,50 (2H, κ, J = 6,8 Гц, CH ₂ CH ₃); 7,14 (2H, уш. c, NH ₂); 7,70 (1H, c, H-3); 7,90 (1H, c, H-8) ¹³ C: 14,9; 28,6; 43,5; 94,0; 128,8; 129,2; 130,9; 135,9; 155,5; 159,6
3c	1666 (C=N) 3366, 3120 (NH ₂)	¹ H: 1,71 (9H, c, 3×CH ₃); 3,58 (3H, c, N-CH ₃); 7,12 (2H, уш. c, NH ₂); 7,72 (1H, c, H-3); 7,87 (1H, c, H-8) ¹³ C: 29,6; 41,1; 59,8; 98,0; 128,0; 130,1; 137,6; 135,9; 155,1; 159,2
3d	1672(C=N) 3374, 3125 (NH ₂)	¹ H: 3,59 (3H, c, N-CH ₃); 7,21 (2H, уш. c, NH ₂); 7,37 (1H, т, J = 7,2 Гц, PhH); 7,59 (2H, т, J = 7,6 Гц, PhH); 7,81–7,88 (3H, м, PhH, H-3); 8,26 (1H, c, H-8) ¹³ C: 29,0; 95,0; 121,8; 126,4; 128,5; 130,0; 130,2; 135,0; 137,7; 140,6; 156,5; 160,4
5a	1718 (C=O) 3260, 3119 (NH ₂)	¹ H: 3,40 (3H, c, N-CH ₃); 7,76 (1H, c, H-3); 7,89 (1H, c, H-7). Сигнали протонів груп NH ₂ та COOH перебувають в обміні з молекулами води дейтеророзчинника. ¹³ C: 36,8; 115,0; 124,1; 127,5; 129,1; 131,4; 141,9; 165,8
5b	1719 (C=O) 3263, 3126 (NH ₂)	¹ H: 1,38 (3H, т, J = 7,2 Гц, CH ₃); 4,40 (2H, κ, J = 7,2 Гц, CH ₂); 7,57 (1H, c, H-3); 7,80 (1H, c, H-7). Сигнали протонів груп NH ₂ та COOH перебувають в обміні з молекулами води дейтеророзчинника. ¹³ C: 15,1; 44,4; 118,8; 124,1; 126,4; 127,2; 130,3; 142,4; 166,5
5c	1716 (C=O) 3259, 3130 (NH ₂)	¹ H: 1,73 (9H, c, 3 × CH ₃); 7,89 (1H, c, H-3); 7,94 (1H, c, H-7). Сигнали протонів груп NH ₂ та COOH перебувають в обміні з молекулами води дейтеророзчинника. ¹³ C: 30,0; 62,3; 110,0; 125,6; 126,4; 128,7; 132,1; 152,7; 167,1
5d	1721 (C=O) 3266, 3127 (NH ₂)	¹ H: 7,42 (1H, т, J = 7,2 Гц, PhH); 7,62 (2H, т, J = 6,8 Гц, PhH); 7,73 (2H, д, J = 7,6 Гц, PhH); 8,15 (1H, c, H-3); 8,58 (1H, c, H-7). Сигнали протонів груп NH ₂ та COOH перебувають в обміні з молекулами води дейтеророзчинника. ¹³ C: 108,6; 121,5; 124,6; 126,2; 126,8; 129,8; 132,9; 139,3; 143,4; 156,3; 168,2
6a	1705 (C=O) 3275, 3150 (NH)	¹ H: 3,99 (3H, c, N-CH ₃); 7,43 (1H, c, H-3); 7,92 (1H, c, H-8); 10,99 (1H, уш. c, N-H); 11,25 (1H, уш. c, N-H) ¹³ C: 35,9; 95,6; 124,6; 130,7; 130,9; 133,7; 143,5; 155,5
6b	1703 (C=O) 3276, 3147 (NH)	¹ H: 1,35 (3H, т, J = 7,2 Гц, CH ₃); 4,38 (2H, κ, J = 7,1 Гц, CH ₂); 7,49 (1H, c, H-3); 7,96 (1H, c, H-8); 11,07 (1H, уш. c, N-H); 11,32 (1H, уш. c, N-H) ¹³ C: 14,7 (CH ₃); 42,9 (CH ₂); 96,1; 123,9; 129,7; 131,0; 134,1; 144,2; 155,7
6c	1701 (C=O) 3278, 3152 (NH)	¹ H: 1,66 (9H, c, 3 × CH ₃); 7,57 (1H, c, H-3); 7,92 (1H, c, H-8); 10,90 (1H, уш. c, N-H); 11,32 (1H, уш. c, N-H) ¹³ C: 29,6; 60,1; 98,4; 124,9; 128,9; 130,4; 135,5; 143,5; 155,9
6d	1708 (C=O) 3281, 3148 (NH)	¹ H: 7,28 (1H, т, J = 7,2 Гц, PhH); 7,47 (2H, т, J = 7,4 Гц, PhH); 7,55 (2H, т, J = 7,4 Гц, PhH); 8,08 (1H, c, H-3); 8,32 (1H, c, H-8); 11,12 (1H, уш. c, N-H); 11,37 (1H, уш. c, N-H) ¹³ C: 99,1; 122,1; 126,2; 128,5; 129,9; 130,3; 136,3; 138,4; 140,2; 145,7; 160,4



a: R = Me; **b:** R = Et; **c:** R = *t*-Bu; **d:** R = Ph

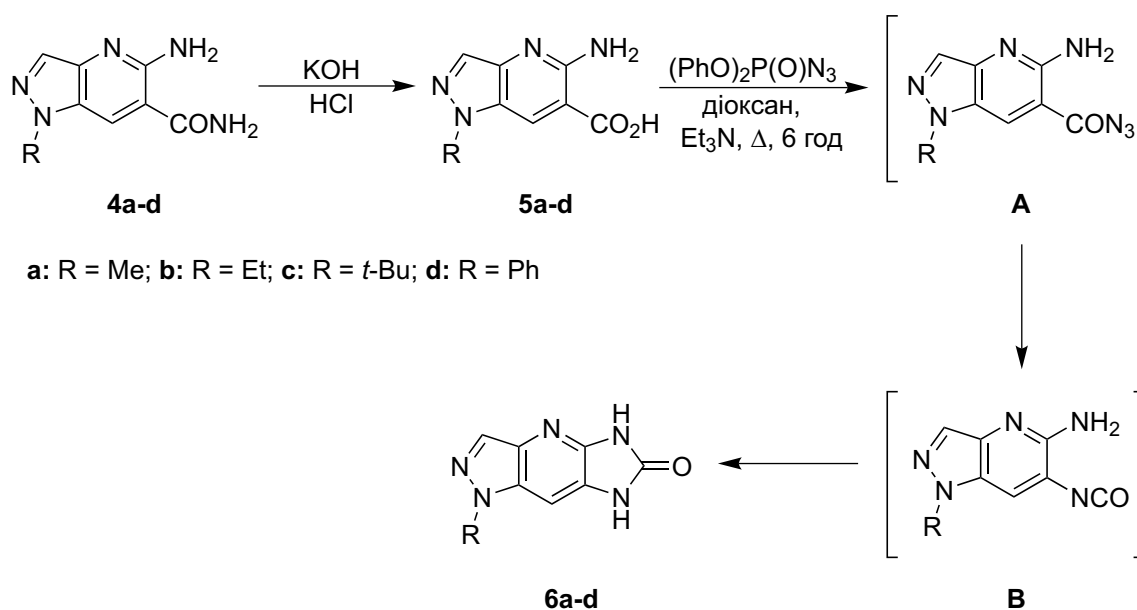
Схема 1. Синтез 6-аміноімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів **3a–d**

Експериментальна частина

¹H-спектри синтезованих сполук у таблетках KBr записано на приладі Bruker Vertes 70. Спектри ¹H ЯМР отримали на спектрометрі Varian VXR-400 (399,97 МГц) в імпульсному Фур'є-режимі в розчинах DMSO-*d*₆, внутрішній стандарт – ТМС. Спектри ¹³C ЯМР одержано на спектрометрі Bruker Advance DRX-500 (125,75 МГц) в імпульсному Фур'є-режимі в розчинах DMSO-*d*₆, внутрішній стандарт – ТМС. Хромато-мас-спектри отримали на приладі Agilent LC\MSD SL; колонка Zorbax SB-C18, 4,6 × 15 мм, 1,8 мкм (PN 82(c)75-932); розчинник ДМСО, іонізація електророзпиленням за атмосферного тиску. Елементний аналіз виконано на приладі Perkin Elmer CHN Analyzer серії 2400 в аналітичній лабораторії Інституту органічної хімії НАН України. Температури плавлення визначено на столику Кофлера і не відкореговано. Перебіг реакцій контролювали методом тонкошарової хроматографії.

Загальна методика синтезу 6-аміноімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів **3a–d.** До розчину 2,51 ммоль альдегідів **1a–d** в 25 мл льодяної оцтової кислоти послідовно додавали 0,3 г (2,65 ммоль) креатиніну (**2**), 0,2 мл (2,52 ммоль) піролідину, перемішували 1 год за кімнатної температури та кип'ятили 4 год (у випадку альдегідів **1a,b**), 5 год (у випадку альдегіду **1c**) та 6 год (у випадку альдегіду **1d**). Після завершення реакції розчинник відгнали за зниженого тиску, до отриманого олієподібного продукту додавали 50 мл води та інтенсивно перемішували до утворення осаду, який відфільтровували, сушили на повітрі та кристалізували з етанолу.

Загальна методика синтезу 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонових кислот **5a–d.** До суспензії 2,2 ммоль аміду **4a–d** в 20 мл етанолу додавали 2,2 мл 2 М розчину калій гідроксиду. Реакційну суміш кип'ятили протягом 6 год, охолоджували, упарювали за зниженого тиску, до залишку



a: R = Me; **b:** R = Et; **c:** R = *t*-Bu; **d:** R = Ph

Схема 2. Синтез імідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридин-6(5H)-онів **6a–d**

додавали 40 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти, утворений осад відфільтровували і сушили на повітрі.

Загальна методика синтезу імідазо[4,5-*b*]-піразоло[3,4-*e*]піридин-6(5*H*)-онів 6a–d. До суспензії 2,0 ммоль амінокислоти 5a–d у 50 мл безводного діоксану додавали 0,85 мл (6,1 ммоль) триетиламіну і за інтенсивного перемішування додавали 0,58 г (2,1 ммоль) дифенілфосфорилазиду. Суміш поступово нагрівали до 100°C, витримували за заданої температури протягом 6 год, розчинник відганяли за зниженого тиску, до залишку додавали 20 мл пропан-2-олу, утворений

осад фільтрували, сушили на повітрі та перекристалізували з льодяної оцтової кислоти.

Висновки

Розроблено ефективні підходи до одержання нових біопривабливих молекулярних платформ – 6-аміно- та 6-оксоімідазо[4,5-*b*]піразоло[3,4-*e*]піридинів, які ґрунтуються на циклоконденсаціях відповідно *N*-Вос-4-амінопіразол-5-карбальдегідів із креатиніном та 5-амінопіразоло[4,3-*b*]піридин-6-карбонових кислот із дифенілфосфорилазидом.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

- Mantlo, N. B.; Chakravarty, P. K.; Ondeyka, D. L.; Siegl, P. K.; Chang, R. S.; Lotti, V. J.; Faust, K. A.; Chen, T. B.; Schorn, T. W.; Sweet, C. S. Potent, orally active imidazo[4,5-*b*]pyridine-based angiotensin II receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (9), 2919–2922. <https://doi.org/10.1021/jm00113a035>.
- Nicolai, E.; Goyard, J.; Benchetrit, T.; Teulon, J.-M.; Caussade, F.; Virone, A.; Delchambre, C.; Cloarec, A. Synthesis and structure-activity relationships of novel benzimidazole and imidazo[4,5-*b*]pyridine acid derivatives as thromboxane A2 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (9), 1175–1187. <https://doi.org/10.1021/jm00061a008>.
- Penning T. D.; Chandrakumar N. S.; Desai B. N.; Djuric S. W.; Gasielki A. F.; Malecha J. W.; Miyashiro J. M.; Russell M. A.; Askonas L. J.; Gierse J. K.; Harding E. I.; Highkin M. K.; Kachur J. F.; Kim S. H.; Villani-Price D.; Pyla E. Y.; Ghoreishi-Haack N. S.; Smith W. G. Synthesis of imidazopyridines and purines as potent inhibitors of leukotriene A4 hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (6), 1137–1139. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(03\)00039-8](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(03)00039-8).
- Cristalli, G.; Vittori, S.; Eleuteri, A.; Volpini, R.; Camaioni, E.; Lupidi, G.; Mahmood, N.; Bevilacqua, F.; Palu G. Synthesis and biological evaluation of N6-cycloalkyl derivatives of 1-deazaadenine nucleosides: a new class of anti-human immunodeficiency virus agents. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (20), 4019–4025. <https://doi.org/10.1021/jm00020a017>.
- Ménard, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Dijkstra, H. P.; Niculescu-Duvaz, D.; Suijkerbuijk, B. M. J. M.; Zambon, A.; Nourry, A.; Roman, E.; Davies, E.; Manne, H. A.; Friedlos, F.; Kirk, R.; Whittaker, S.; Gill, A.; Taylor, R. D.; Marais, R.; Springer C. J. Novel Potent BRAF Inhibitors: toward 1 nm compounds through optimization of the central phenyl ring. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (13), 3881–3891. <https://doi.org/10.1021/jm900242c>.
- Shu, C.; Ge, H.; Song, M.; Chen, J.; Zhou, H.; Qi, Q.; Wang, F.; Ma, X.; Yang, X.; Zhang, G.; Ding, Y.; Zhou, D.; Peng, P.; Shih, C.; Xu, J.; Wu, F. Discovery of Imigliptin, a Novel Selective DPP-4 Inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (8), 921–926. <https://doi.org/10.1021/ml5001905>.
- Lindström, S.; Ahmad, T.; Grivas, S. Synthesis of the mutagenic 2-amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-*b*]pyridine (1,6-DMIP) and five of its isomers. *Heterocycles* **1994**, *38* (3), 524–540. <https://doi.org/10.3987/COM-93-6573>.
- Tanga, M. J.; Bradford, W. W.; Bupp, J. E.; Kozocas J. A. Syntheses of two potential food mutagens. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *40* (3), 569–573. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570400403>.
- Ronne, E.; Olsson, K.; Grivas, S. One-Step Synthesis of 2-Amino-1-methylimidazo[4,5-*b*]quinolone. *Synt. Commun.* **1994**, *24* (10), 1363–1366. <https://doi.org/10.1080/00397919408011739>.
- Björk, M.; Grivas, S. Synthesis of novel 2-aminoimidazo[4,5-*b*]pyridines, including the thieno analogue of the cooked-food mutagen IFP. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *43* (1), 101–109. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570430116>.
- Meanwell, N. A.; Roth, H. R.; Smith, E. C. R.; Wedding, D. L.; Wright, J. J. K.; Fleming, J. S.; Gillespie, E. 1,3-Dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]quinolin-2-ones – inhibitors of blood platelet cAMP phosphodiesterase and induced aggregation. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (9), 2906–2916. <https://doi.org/10.1021/jm00113a033>.
- Meanwell, N. A.; Pearce, B. C.; Roth, H. R.; Smith, E. C. R.; Wedding, J. D. L.; Wright, J. K.; Buchanan, J. O.; Baryla, U. M.; Gamberdella, M.; Gillespie, E.; Hayes, D. C.; Zavoico, G. B.; Fleming, J. S. Inhibitors of blood platelet cAMP phosphodiesterase. 2. Structure-activity relationships associated with 1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]quinolin-2-ones substituted with functionalized side chains. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (14), 2672–2687. <https://doi.org/10.1021/jm00092a019>.
- Meanwell, N. A.; Dennis, R. D.; Roth, H. R.; Rosenfeld, M. J.; Smith, C. R. E.; Wright, J. J. K.; Buchanan, J. O.; Brassard, C. L.; Gamberdella, M.; Gillespie, E.; Seiler, S. M.; Zavoico, G. B.; Fleming, J. S. Inhibitors of blood platelet cAMP phosphodiesterase. 3. 1,3-Dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]quinolin-2-one derivatives with enhanced aqueous solubility. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (14), 2688–2696. <https://doi.org/10.1021/jm00092a020>.
- Meanwell, N. A.; Hewawasam, P.; Thomas, J. A.; Wright, J. J. K.; Russell, J. W.; Gamberdella, M.; Goldenberg, H. J.; Seiler, S. M.; Zavoico, G. B. Inhibitors of blood platelet cAMP phosphodiesterase. 4. Structural variation of the side-chain terminus of water-soluble 1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]quinolin-2-one derivatives. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (22), 3251–3264. <https://doi.org/10.1021/jm00074a005>.
- Li, Y.; Guo, Q.; Zhang, C.; Huang, Z.; Wang, T.; Wang, X.; Wang, X.; Xu, G.; Liu, Y.; Yang, S.; Fan, Y.; Xiang, R. Discovery of a highly potent, selective and novel CDK9 inhibitor as an anticancer drug candidate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (15), 3231–3237. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.041>.
- Faria, J. V.; Vegi, P. F.; Miguita, A. G. C.; Dos Santos, M. S.; Boachat, N.; Bernadino, A. M. R. Recently reported biological activities of pyrazole compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *25* (21), 5891–5903. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.035>.
- Kumar, V.; Kaur, K.; Gupta, G. K.; Sharma, A. K. Pyrazole containing natural products: synthetic preview and biological significance. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 735–753. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.053>.
- Küçükgülzel, Ş. G.; Şenkardeş, S.; Recent advances in bioactive pyrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 786–815. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.059>.
- Zhang, H.-Z.; Gan, L.-L.; Wang, H.; Zhou, C.-H. New progress in azole compounds as antimicrobial agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, *17* (2), 122–166. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160630120725>.
- Komogortsev, A. N.; Lichitsky, B. V.; Dudinov, A. A.; Krylov, K. S.; Krayushkin, M. M.; Bogacheva, A. M.; Kobeleva, O. P.; Barachevskii, V. A. Three-component condensation of iminoazolidines with aldehydes and 5-aminopyrazole. *Mendeleev Commun.* **2013**, *23* (4), 222–223. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2013.07.015>.
- Lougiakis, N.; Marakos, P.; Pouli, N.; Fragopoulou, E.; Tenta, R. Synthesis of new nebularine analogues and their inhibitory activity against adenosine deaminase. *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63* (2), 134–142. <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00731>.
- Papadakis, G.; Gerasi, M.; Snoeck, R.; Marakos, P.; Andrei, G.; Lougiakis, N.; Pouli, N. Synthesis of new imidazopyridine nucleoside derivatives designed as maribavir analogues. *Molecules* **2020**, *25* (19), 4531–4544. <https://doi.org/10.3390/molecules25194531>.
- Chrisman, W.; Tanga, M. J.; Knize, M. G. Synthesis and mutagenic potency of structural isomers of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, *45* (6), 1641–1645. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570450614>.

24. Nguyen, T.-M.; Novak, M. Synthesis and decomposition of an ester derivative of the procarcinogen and promutagen, PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenyl-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine: Unusual Nitrenium Ion Chemistry. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (13), 4698–4706. <https://doi.org/10.1021/jo070306p>.
25. Deasy, R. E.; Slatery, C. N.; Maguire, A. R.; Kjell, D. P.; Hawk, M. K. N.; Joo, J. M.; Gu, R. L.; Moynihan, H. Preparation of 2-aminopyridoimidazoles and 2-aminobenzimidazoles via phosphorus oxychloride-mediated cyclization of aminoureas. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (8), 3688–3695. <https://doi.org/10.1021/jo500360k>.
26. Gritzalis, D.; Park, J.; Chiu, W.; Cho, H.; Lin, Y. S.; Schutter, J. W.; Lacbay, C. M.; Zielinski, M.; Berghuis, A. M.; Tsantrizos, Y. S. Probing the molecular and structural elements of ligands binding to the active site versus an allosteric pocket of the human farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (5), 1117–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.089>.
27. Rosenberg, A. J.; Zhao, J.; Clark, D. A. Synthesis of imidazo[4,5-*b*]pyridines and imidazo[4,5-*b*]pyrazines by palladium catalyzed amidation of 2-chloro-3-amino-heterocycles. *Org. Lett.* **2012**, *14* (7), 1764–1767. <https://doi.org/10.1021/ol300359s>.
28. Choshi, T.; Tonari, A.; Yoshioka, H.; Harada, K.; Sugino, E.; Hibino, S. Synthesis of mutagenic heterocyclic amines PhIP and DMIP. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (27), 7952–7954. <https://doi.org/10.1021/jo00079a055>.
29. Takeda, K.; Ogura, H. Studies on Heterocyclic Compounds. XLIII. Insertion reaction of carbonyl group using disuccinimido carbonate (DSC). *Synt. Commun.* **1982**, *12* (3), 213–217. <https://doi.org/10.1080/00397918208063680>.
30. Liu, Y.; Zhang, W.; Sayre, L. M. A straightforward synthesis of pentosidine framework. *J. Heterocyclic Chem.* **2010**, *47* (3), 683–686. <https://doi.org/10.1002/jhet.374>.
31. Kourafalos, V. N.; Marakos, P.; Pouli, N.; Terzis, A.; Townsend, L. B. Synthesis of 7-aminopyrazolo[3,4-*c*]pyridine as a probe for the preparation of compounds of pharmacological interest. *Heterocycles* **2002**, *57* (12), 2335–2343. <https://doi.org/10.3987/COM-02-9621>.
32. Rodgers, G. R.; Neish, W. J. P.; Linear expanded xanthines. *Monatsh. Chem.* **1986**, *117* (5-6), 879–882. <https://doi.org/10.1007/BF00810080>.
33. Dornow, A.; Hahmann, O. Synthesis of 2-hydroxy-4, 5-imidazo-2, 3-pyridines. *Arch. Pharm.* **1957**, *290* (1), 20–31. <https://doi.org/10.1002/ardp.19572900104>.
34. Banda, V.; Gautham, S. K.; Pillalamarri, S. R.; Chavva, K.; Banda, N. Synthesis of novel 1,2,3-triazole/isoxazole-functionalized imidazo[4,5-*b*]pyridine-2(3*H*)-one derivatives, their antimicrobial and anticancer activity. *J. Heterocycl. Chem.* **2016**, *53* (4), 1168–1175. <https://doi.org/10.1002/jhet.2370>.
35. Senanayake, C. H.; Fredenburgh, L. E.; Reamer, R. A.; Liu, J.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J. Magnesium-assisted imidazole formation from unreactive ureas. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (32), 5775–5778. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)78181-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)78181-0).
36. Lee, H.; Kim, D.-G.; Banskota, S.; Lee, Y. K.; Nam, T.; Kim, J.-A.; Jeong, B.-S. Pyridoxine-derived bicyclic amido-, ureido-, and carbamato-pyridinols: synthesis and antiangiogenic activities. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (43), 8702–8710. <https://doi.org/10.1039/C4OB01221F>.
37. Casimiro-Garcia, A.; Filzen, G. F.; Flynn, D.; Bigge, C. F.; Chen, J.; Davis, J. A.; Dudley, D. A.; Edmunds, J. J.; Esmaeil, N.; Geyer, A.; Heemstra, R. J.; Jalaie, M.; Ohren, J. F.; Ostroski, R.; Ellis, T.; Schaum, R. P.; Stoner, C. Discovery of a series of imidazo[4,5-*b*]pyridines with dual activity at angiotensin II type 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (12), 4219–4233. <https://doi.org/10.1021/jm200409s>.
38. Senanayake, C. H.; Fredenburgh, L. E.; Reamer, R. A.; Liu, J.; Roberts, F. E.; Humphrey, G.; Thompson, A. S.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J.; Sinkai, I. New approach to the imidazolotidine moiety of MK-996. *Heterocycles* **1996**, *42* (2), 821–830. <https://doi.org/10.3987/COM-95-S91>.
39. Prakash, O.; Batra, H.; Kaur, H.; Sharma, P. K.; Sharma, V.; Singh, S. P.; Moriarty, R. M. Hypervalent iodine oxidative rearrangement of anthranilamides, salicylamides and some β -substituted amides: a new and convenient synthesis of 2-benzimidazolones, 2-benzoxazolones and related compounds. *Synthesis* **2001**, *2001* (4), 541–543. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12346>.
40. Zhu, Z.; Lippa, B. S.; Townsend, L. B. A novel photo-assisted annulation reaction for the synthesis of 6,7-dichloroimidazo[4,5-*b*]quinolin-2-one. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *37* (12), 1937–1940. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00308-5](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00308-5).
41. Yakovenko, G. G.; Lukianov, O. A.; Bol'but, A. V.; Vovk, M. V. N-Boc-4-aminopyrazole-5-carbaldehydes in Friendländer synthesis of pyrazolo[4,3-*b*]pyridines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2019**, *55* (4-5), 379–385. <https://doi.org/10.1007/s10593-019-02468-8>.
42. Yakovenko, G. G.; Lukianov, O. A.; Yahodkina-Yakovenko, M. S.; Vovk, M. V. Synthesis of 5-amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*b*]pyridine derivatives and annulation of imidazole and pyrimidine rings thereto. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2020**, *56* (3), 347–354. <https://doi.org/10.1007/s10593-020-02666-9>.

Received: 05. 02. 2021

Revised: 12. 02. 2021

Accepted: 15. 02. 2021

S. Yu. Sheiko¹, A. S. Shalamay²¹ V. P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine1, Murman'ska str., Kyiv, 02660, Ukraine. E-mail: ssheiko@ukr.net² PJSC SIC "Borshchahivskiy CPP", Kyiv, Ukraine

The determination of the phytochemical composition of the Altabor substance

The development of medicines based on alder cone extracts led to the introduction of Altan and Altabor medicines into medical practice. The technology of extraction cake from cones has made it possible to obtain extracts with different therapeutic properties.

Aim. To develop an effective method for studying the qualitative composition of the Altabor substance and determine the quantitative content of its components.

Results and discussion. The Altabor substance is a complex mixture of ellagitannins containing more than 70 components. The main components of the extract (or their isomers) were determined by mass spectrometry and by comparing the retention times with the literature data. Gallic, ellagic, valoneic acids dilactone were conclusively determined by adding reference standards of these acids to the extract. The substance contains the following compounds: 2,3-hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-glucose $t_{r1} = 0.55$ min, $t_{r2} = 0.89$ min (α and β isomers), 4,6-O-[(S)-valeonyl]-D-glucose (isomer) $t_r = 0.64$ min, gallic acid $t_r = 1.198$ min, pedunculagin $t_{r1} = 3.63$ min, $t_{r2} = 4.62$ min (α and β isomers), proecoxin A (isomer) $t_r = 4.78$ min, valoneic acid dilactone $t_r = 6.19$ min, ellagic acid pentoside (isomer) $t_r = 7.07$ min, ellagic acid $t_r = 7.335$ min.

Experimental part. The composition analysis was performed using an Agilent 1200 chromatograph with a UV detector, a G6140 mass detector, an Alltech 3300 light scattering detector (ELSD), as well as the Agilent ChemStation Rev.B.04.03 software. The molecular weights of the compounds in the extract were determined using the method of mass spectrometry of ESI-electrospray ionization. The determination of the components was performed using an ultraviolet detector at a wavelength of 280 nm. The column was Rapid Resolution HT Cartige, 4.6 \times 30 mm, 1.8 μ m, Zorbax SB-C18.

Conclusions. A new effective method of analysis of the Altabor substance has been developed; it allows determining the qualitative and quantitative content of its structural components. The method gives the possibility to control the process of obtaining the Altabor substance, study the dependence of its composition on the conditions of its obtaining, batch number, place, time of the natural raw material collection, and study the composition of other pharmaceutical substances, the plant raw material containing tannins. The advantage of the method is the short time (up to 10 min) of analysis using high-performance liquid chromatography at high resolution.

Key words: gallotannins; ellagitannins; Altabor; chemical composition; structure; HPLC (high-performance liquid chromatography)

С. Ю. Шейко¹, А. С. Шаламай²¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії імені В. П. Кухаря НАН України, Україна² ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна

Визначення фітохімічного складу субстанції Альтабор

Розробка лікарських засобів на основі екстрактів суплідь вільхи вперше завершилась впровадженням у медичну практику препаратів Альтан та Альтабор. Особливості технології екстрагування підготовленого шроту суплідь дозволило отримувати екстракти з різними терапевтичними властивостями.

Мета. Розробити ефективний метод вивчення якісного складу субстанції Альтабор із визначенням кількісного вмісту компонентів.

Результати та їх обговорення. Субстанція Альтабор становить собою складну багатокомпонентну суміш елаготанінів, що містить більше 70 компонентів. Основні компоненти екстракту визначено за допомогою мас-спектрометрії, а також шляхом порівняння часів утримування з літературними даними. Галову, елагову, валонову кислоти визначено остаточно шляхом додавання в екстракт стандартів цих кислот. До його складу входять ідентифіковані сполуки: 2,3-гексагідроксибензоїл-(α/β)-глюкоза $t_{r1} = 0.55$ хв, $t_{r2} = 0.89$ хв (α та β ізомери), 4,6-О-[(S)-валеоніл]-D-глюкоза (ізомер) $t_r = 0.64$ хв, галова кислота $t_r = 1.198$ хв, педункулагін $t_{r1} = 3.63$ хв, $t_{r2} = 4.62$ хв (α та β ізомери), праекоксін А (ізомер) $t_r = 4.78$ хв, дилактон валонівної кислоти $t_r = 6.19$ хв, пентозид елагової кислоти (ізомер) $t_r = 7.07$ хв, елагова кислота $t_r = 7.335$ хв.

Експериментальна частина. Аналіз складу проводили за допомогою Agilent 1200 хроматографа з УФ-детектором, мас-детектором G6140 та детектором світлорозсіювання (ELSD) Alltech 3300. Програмне забезпечення Agilent ChemStation Rev.B.04.03. Молекулярні маси сполук, які входять до складу екстракту, визначено за допомогою методу мас-спектрометрії іонізацією розпиленням в електричному полі (ESI-electrospray ionization). Визначення компонентів проводили із застосуванням ультрафіолетового детектора за довжини хвилі λ 280 нм. Колонка: Rapid Resolution HT Cartige 4,6 \times 30 мм, 1,8 мкм, Zorbax SB-C18.

Висновки. Розроблено новий ефективний метод аналізу фармсубстанції Альтабор, який дозволяє вивчати її якісний склад та визначати кількісний вміст компонентів. Метод дозволяє контролювати процес виробництва субстанції Альтабор, вивчати залежність її складу від умов отримання, номеру партії, місця, часу збору природної сировини, вивчати склад інших фармсубстанцій, природної сировини, що містить таніни. Перевага методу – короткий час (до 10 хвилин) проведення аналізу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії за високої роздільної здатності.

Ключові слова: галотаніни; елаготаніни; Альтабор; хімічний склад; структура; ВЕРХ (високоефективна рідина хроматографія)

European alder (*Alnus glutinosa*) and grey alder (*Alnus incana*) are found almost on the whole territory of Ukraine, especially on the forest lowland wetlands and floodplains of many small and large rivers and firstly in the Polissia area [1].

Since ancient times, the interest of folk medicine to this plant has been associated with the healing properties of its bark and cones. The high content of tannins, namely gallo- and ellagitannins, reveals the therapeutic effect of tinctures and decoctions from the parts of this plant [2].

The development of medicines based on alder cone extracts has led to the introduction of such medicines as Altan and Altabor into medical practice. The technology of extraction cake from cones has made it possible to obtain extracts with different therapeutic properties [3, 4].

Thus, the use of 75% aqueous ethanol under the conditions of filtration extraction of European alder (*Alnus glutinosa*) infructescence and grey alder (*Alnus incana*) allows obtaining a dry extract for the preparation of Altan medicine prescribed for diseases of the digestive tract of different localization – for the complex treatment of gastric ulcers and various sections of the stomach and small and large intestine, as well as infections of the digestive tract [5–9]. The hepatoprotective effect of Altan medicine in the case of acute and chronic liver lesions is quite pronounced and manifests itself even when using the drug in low doses [10]. The drug tablet contains 10 mg of the Altan extract calculated with reference to dried substance, and the content of ellagitannins amounts to 60% in it.

Altabor medicine is produced on the basis of the aqueous extract of European alder (*Alnus glutinosa*). The active ingredients of the dry extract – gallo- and ellagitannins in the composition of the drug have a marked antiviral effect against influenza viruses and herpes. This drug, which tablet contains 20 mg of the dry extract, is used in the treatment of influenza, acute respiratory viral infections, and for the prevention of these diseases [3, 4, 11].

The active agents of both substances of the dry extract of the European alder infructescence exhibit a pronounced antioxidant, anti-inflammatory and membrane-stabilizing action, which complements their pharmacological effects [3, 4].

The technological processes of obtaining these dry extracts in the production of both drugs may alter their true phytochemical composition, and this may be due to their ability to easily hydrolyze gallo- and ellagitannins, constituents of alder cones (*Fructus Alni*).

In connection with this, we should further study the natural phytochemical composition of biologically active substances of European alder, in particular tannins, which, in fact, has not been studied with some

exceptions [12]. It is also important to examine the substance from the alder raw material – Altabor since its constant composition of active ingredients, namely tannins, will enable to achieve a guaranteed permanent pharmacological effect of drugs from this substance. The paper [12] presents the isolation of three substances – tannins in the extract from cones by four preparative HPLC methods. The substances were obtained in very small amounts of 1–8 mg. The qualitative HPLC chromatograms of alder cone extracts, which would determine their component composition, are not described in the literature. Moreover, in Ukraine, the studies to determine the phytochemical composition of the natural raw material containing hydrolyzable tannins, as well as pharmaceuticals manufactured based on this raw material, have not been carried out at all. Only the total tannin content was determined. Altabor and Altan have been manufactured since 1990s by the PJSC SIC “Borshchahivskiy CPP”. The company previously made attempts to obtain high-quality HPLC chromatograms, which would allow studying the qualitative composition of these substances, as well as the raw material, and determine the quantitative content of components, but all of them were unsuccessful [13]. The phytochemical composition of the Altabor substance is unknown. To date, the quality of the Altabor substance is determined by measuring the total amount of tannins by spectrophotometry. The raw material, i.e. the alder cones, has been studied similarly. It is important to find the phytochemical composition of the raw material since its composition can be influenced by such factors as soil properties, the time of the raw material collection, climatic and other conditions under which alder grows [14]. This can affect the manufacturing process. To separate a mixture containing more than 70 substances with the similar chromatographic properties is a complicated task [15]. Therefore, the results presented in this paper are important.

Thus, the aim of this work was to develop an effective method for studying the qualitative composition of the Altabor substance and determine the quantitative content of its components.

To determine the composition, the crushed sample of the Altabor substance (batch No. 301217) was extracted with methyl alcohol. As a method of analysis of the extract obtained the method of high-performance liquid chromatography using an Agilent 1200 chromatograph was proposed.

The extract is a complex multicomponent mixture of tannins with very similar chromatographic properties, which is difficult to separate. In order to select the conditions for successful separation of the extracted ellagitannins, a suitable chromatographic column and solvent systems for elution, as shown in the ex-

perimental part, were selected. On the way to achieve the desired result, namely the creation of the HPLC method that would allow determining the Altabor substance composition, a number of isocratic solvent systems were tested, for example: H₂O:CH₃CN in the ratio of 90:10; H₂O:CH₃CN:THF:HCOOH in the ratio of 70:5:25:0.2; H₂O:CH₃CN:THF:HCOOH in the ratio of 90:5:5:0.2; 0.1N H₃PO₄:0.1N KH₂PO₄:CH₃CN in the ratio of 42.5:42.5:15; H₂O:CH₃CN:THF:HCOOH in the ratio of 80:5:15:0.2, as well as gradient systems, for example: H₂O:CH₃CN with various linear gradients – 0–30; 0–50; 0–100 and others. However, the systems presented in the article turned out to be much better.

For the analysis of such polar substances as tannins it is better to use the chromatographic columns filled with C18 modified silica gel. One should choose the smallest size of particles among available – 1.8 μm. Resolution decreases when 5 μm columns are used.

According to the results of the chromatographic and mass spectrometric studies the Altabor substance is a complex mixture of ellagitannins containing more

than 70 components (see chromatogram, Fig. 1). The main components of the substance (or their isomers) were determined by mass spectrometry and by comparing the retention times with the literature data [16–18]. Gallic (**3**), ellagic (**8**), valoneic acid dilactone (**6**) were conclusively determined by adding reference standards to the substance. The reference standard of valoneic acid dilactone with a purity of more than 98% was obtained by the method described in the experimental part. Its ¹H NMR spectrum and HPLC are shown in Fig. 14, 15. To determine gallic and ellagic acids, commercially available Sigma-Aldrich samples were used.

The HPLC-MS experiments revealed that the Altabor substance contains the following compounds (Fig. 1, 2): 2,3-hexahydroxydiphenyl-(α/β)-glucose (**1**), *t*_{r1} = 0.55 min, *t*_{r2} = 0.89 min (α and β isomers) (Fig. 3); 4,6-O-[(S)-valeonyl]-D-glucose (an isomer) (**2**), *t*_r = 0.64 min (Fig. 4); gallic acid (**3**), *t*_r = 1.198 min; pedunculagin (**4**), *t*_{r1} = 3.63 min, *t*_{r2} = 4.62 min (α and β isomers) (Fig. 5)^a; praecoxin A (**5**) (an isomer), *t*_r = 4.78 min (Fig. 6); valoneic acid dilactone (**6**),

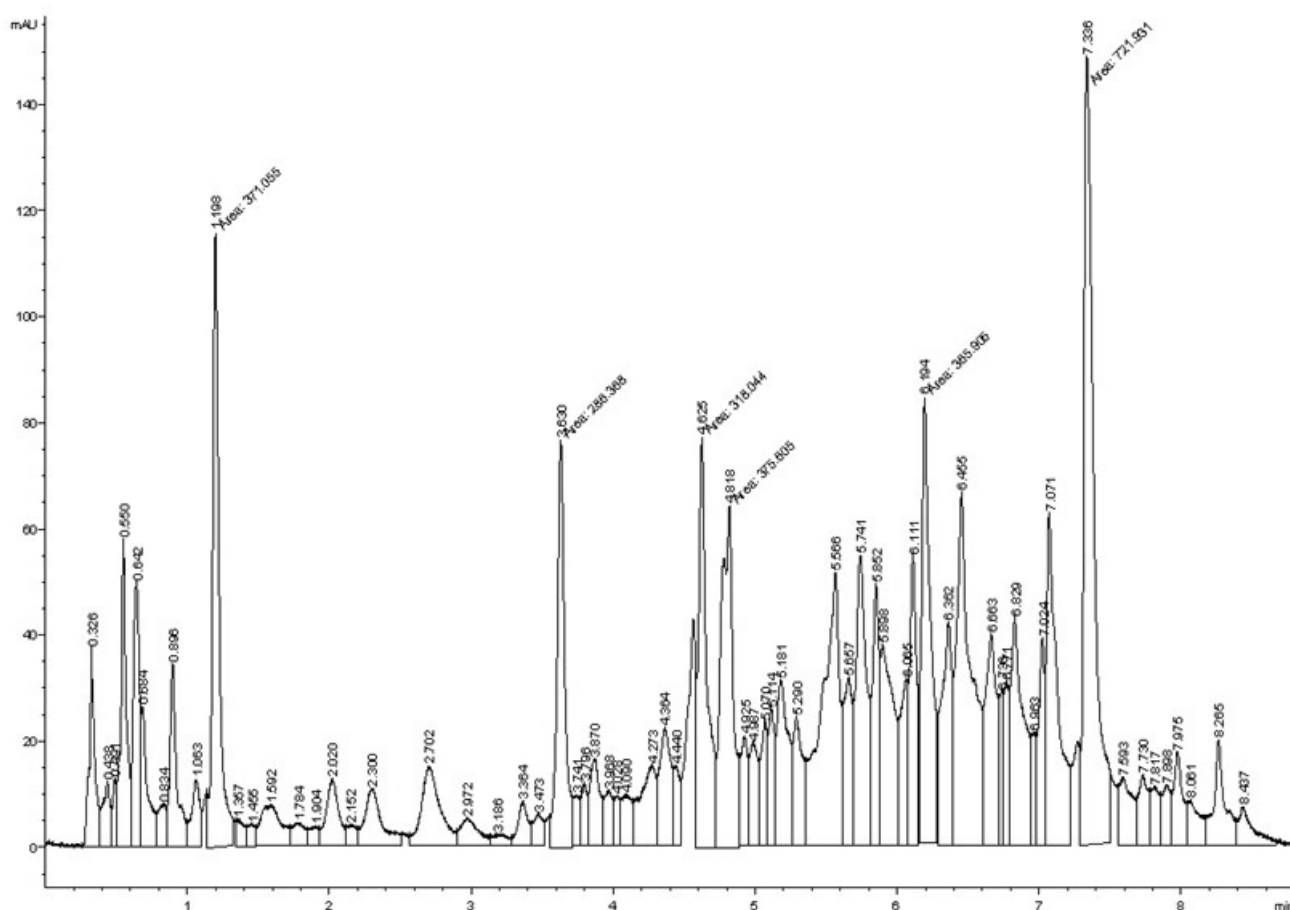


Fig. 1. The chromatogram of the Altabor substance (Batch No. 301217). Methanol Extract. System I. (A) 0.1% HCOOH (aqueous solution), (B) CH₃CN. 0–1.5 min, 100% A (isocratic mode); 1.5–7.5 min, 0–20% B in A (linear gradient); flow-rate – 1 mL/min, 280 nm

^a Mass spectra of the compounds with *t*_r = 3.63 min and 4.62 min are the same. The areas of two peaks with *t*_r = 3.63 min and *t*_r = 4.62 min are almost identical. Having compared the retention times with the literature data we can conclude that two peaks on the chromatogram probably belong to the same substance – α and β pedunculagine isomers (**4**).

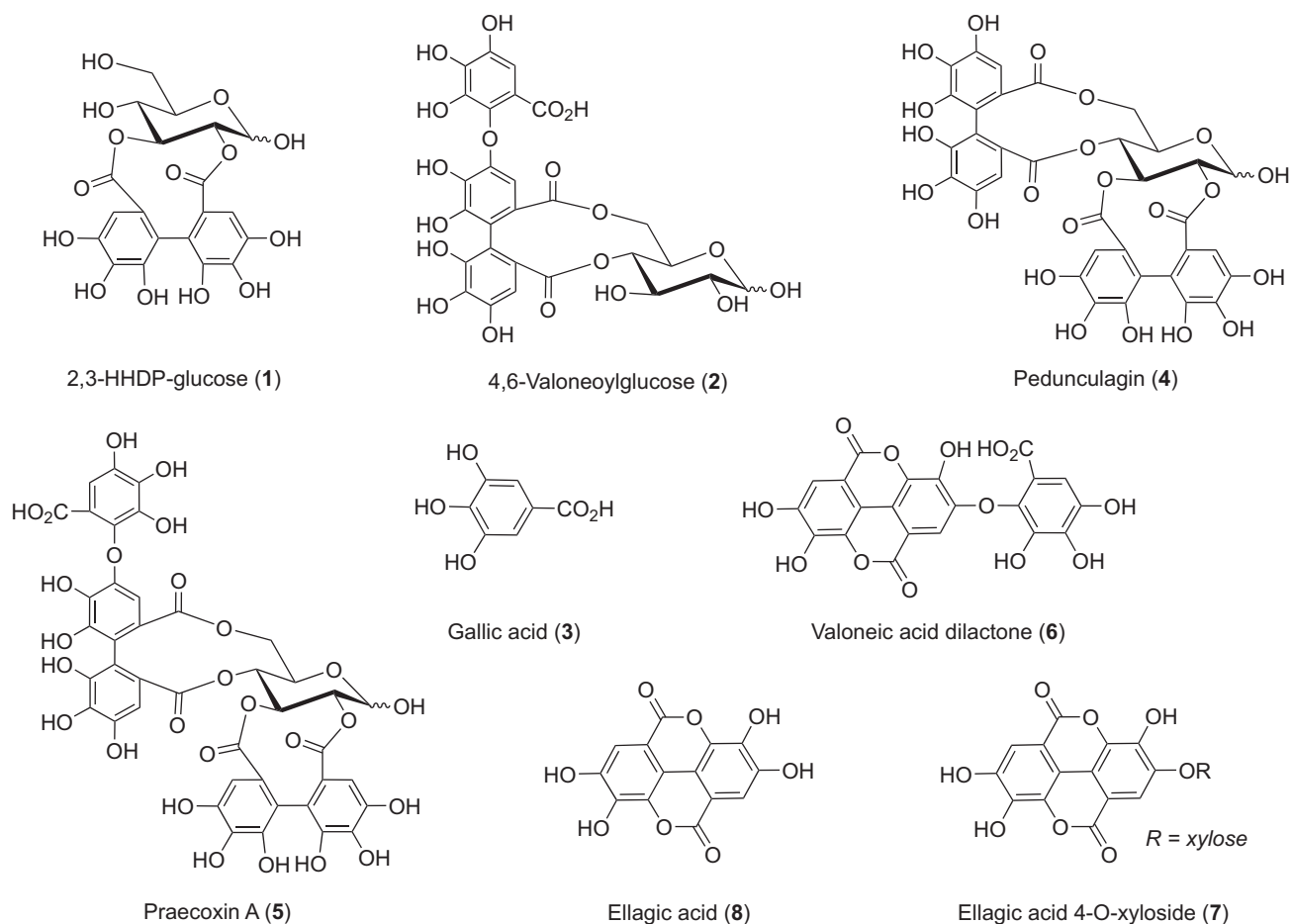


Fig. 2. The main components of the Altabor substance

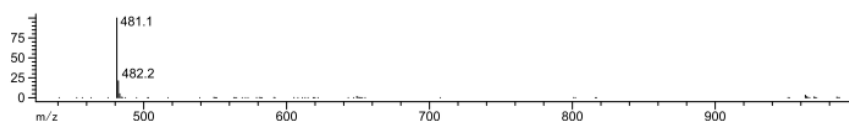


Fig. 3. The negative ion mass spectrum of the compound 1

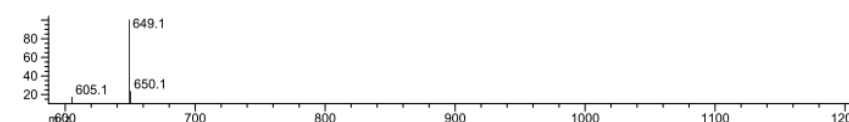


Fig. 4. The negative ion mass spectrum of the compound 2

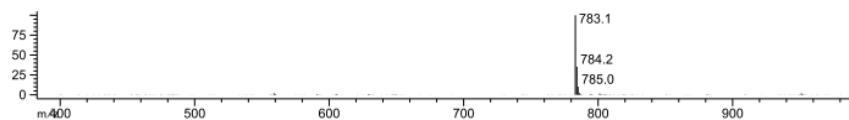


Fig. 5. The negative ion mass spectrum of the compound 4

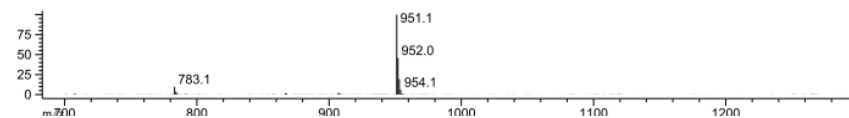


Fig. 6. The negative ion mass spectrum of the compound 5

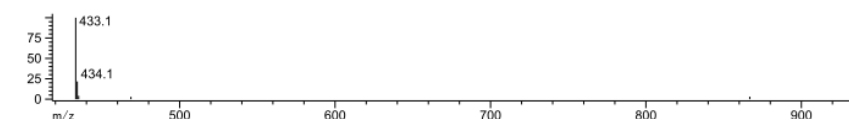


Fig. 7. The negative ion mass spectrum of the compound 7

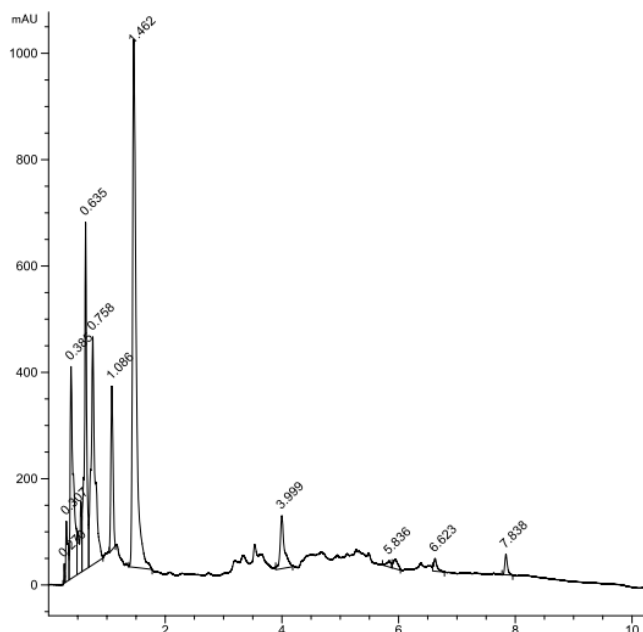


Fig. 8. The chromatogram of the Altabor substance fraction 1 (Diaion HP-20, pure water) (system I)

$t_r = 6.19$ min; ellagic acid pentoside (most probably xyloside, an isomer) (**7**), $t_r = 7.07$ min (Fig. 7); ellagic acid (**8**), $t_r = 7.335$ min. The Altabor extract also contains a mixture of hexoses and possibly pentoses, which are not fixed by the UV detector and are not retained by the C-18 column phase. These compounds can be detected on a light scattering detector at the beginning of the chromatograms with $t_r = 0.3$ min in the form of a mixture.

The Altabor substance was additionally fractionated by column chromatography with a Diaion HP-20 sorbent. While fractionating the starting substance gave fractions containing much less number of compounds

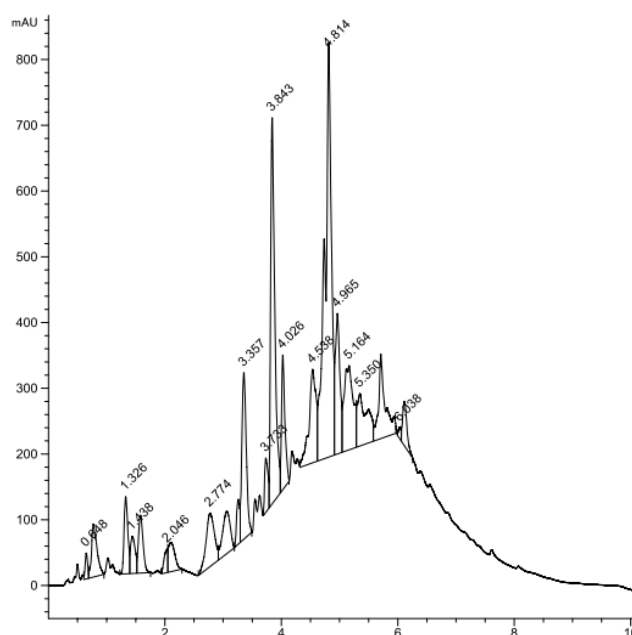


Fig. 9. The chromatogram of the Altabor substance fraction 2 (Diaion HP-20, 10% EtOH) (system I)

than the raw material. Thus, it is easier to analyze such mixtures. It becomes possible to obtain the minor compounds characteristics, which small peaks are hidden by other peaks on the raw material chromatogram. Moreover, re-determination of the molecular masses in fractions is an additional proof of the presence of the compounds previously found.

As an eluent the aqueous solution of ethyl alcohol of different concentrations was used. The concentration of ethyl alcohol was increased stepwise. As the result 5 fractions were obtained. The fraction analysis was performed by HPLC, in particular fraction 1 was obtained by elution of the Altabor substance with water

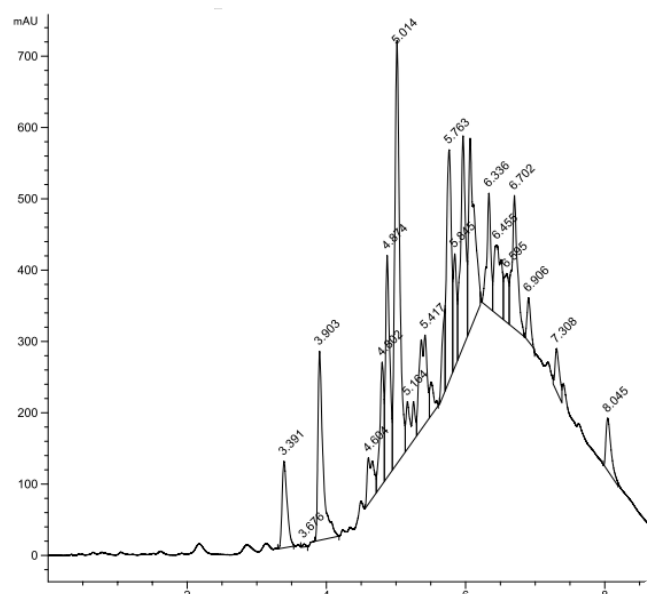


Fig. 10. The chromatogram of the Altabor substance fraction 3 (Diaion HP-20, 20% EtOH) (system I)

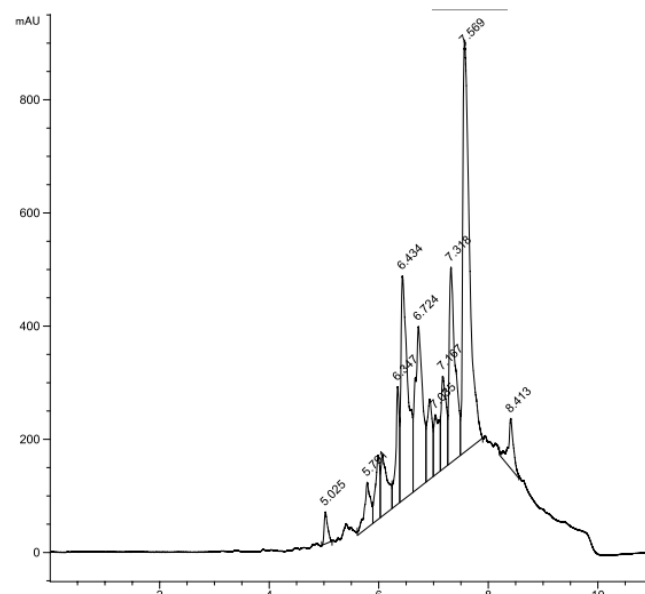


Fig. 11. The chromatogram of the Altabor substance fraction 4 (Diaion HP-20, 40% EtOH) (system I)

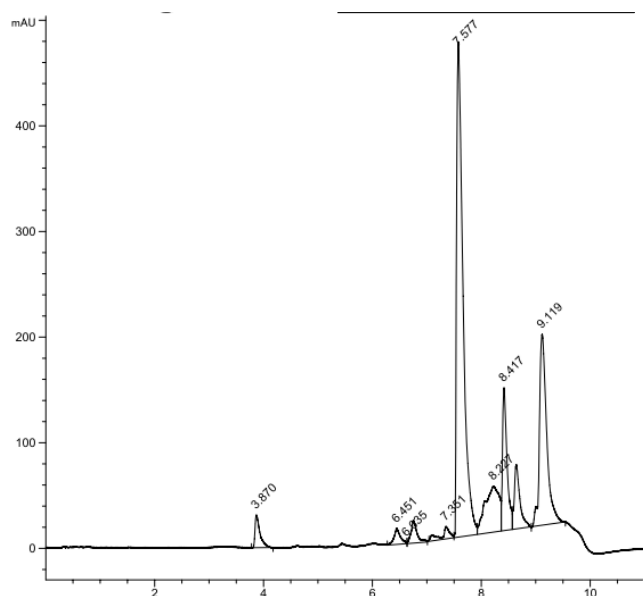


Fig. 12. The chromatogram of the Altabor substance fraction 5 (Diaion HP-20, 96% EtOH) (system I)

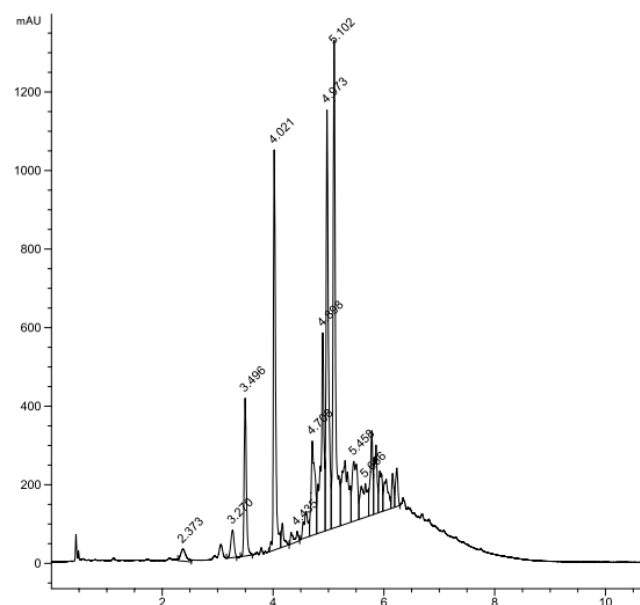


Fig. 13. HPLC repeated chromatographic (Diaion HP-20, 20% EtOH) (system I) separation of fraction 3 (elution with 20% EtOH)

(Fig. 8), fractions 2, 3, 4, 5 by elution with 10%, 20%, 40% and 96% ethyl alcohol, respectively (Fig. 9–12).

The order of the substance release (ellagitannins from the column filled with Diaion HP-20) was similar to the order of the substance release from the HPLC column filled with a sorbent – C18 modified silica gel. The main components of the fraction 1 (Fig. 8) were 2,3-

hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-glucose (**1**), $t_{r1} = 0.63$ min, $t_{r2} = 1.08$ min (α and β isomers), 4,6-O-[[S]-valeonyl]-D-glucose (**2**) (an isomer), $t_r = 0.76$ min, gallic acid (**3**), $t_r = 1.46$ min; the fractions 2 and 3 (Fig. 9 and Fig. 10, respectively) – pedunculagin (**4**), $t_{r1} = 3.84$ min, $t_{r2} = 4.81$ min (α and β isomers), praecoxin A (**5**), $t_r = 4.96$ min; fractions 4 and 5 – ellagic acid (**8**) and

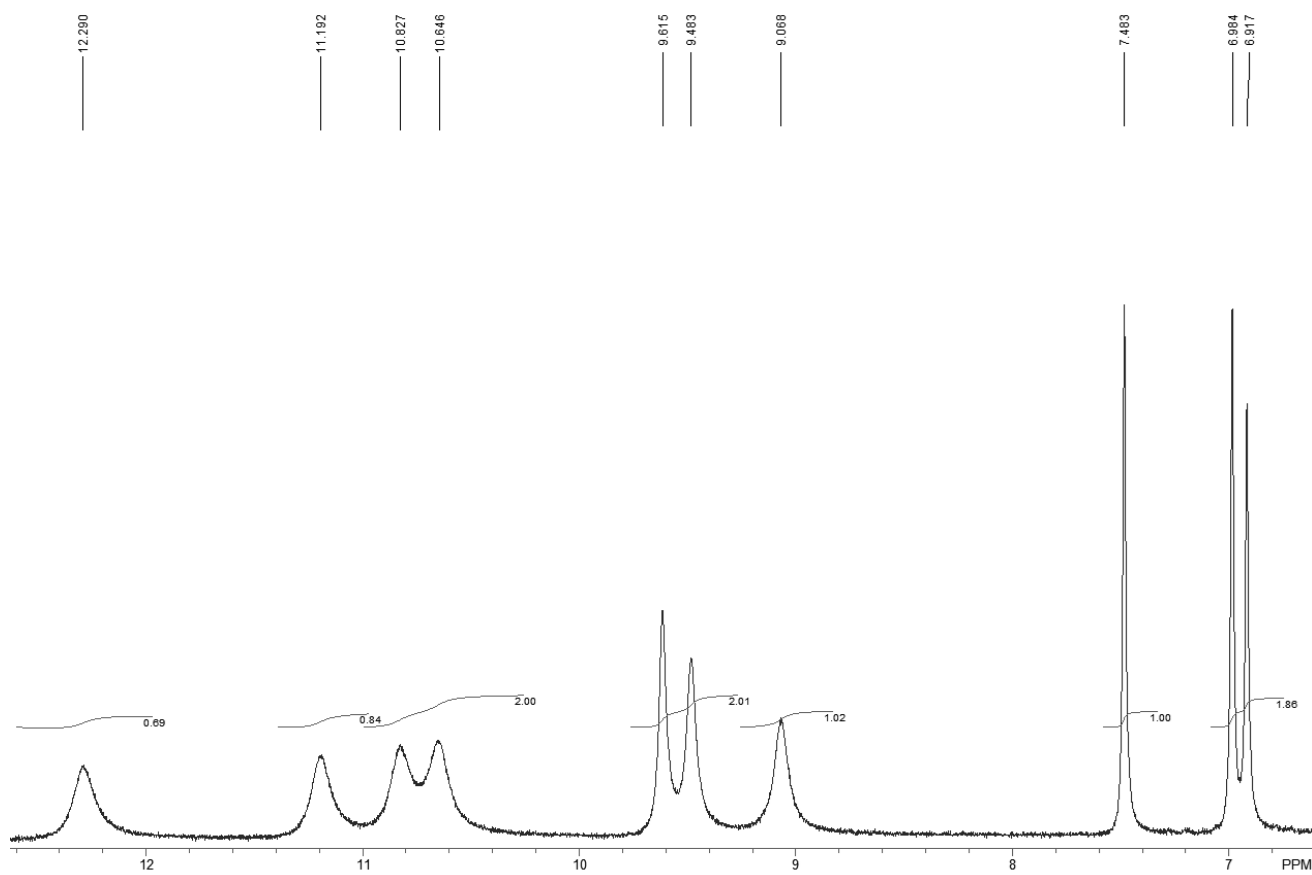


Fig. 14. ^1H NMR spectrum of valoneic acid dilactone in $\text{DMSO-}d_6$

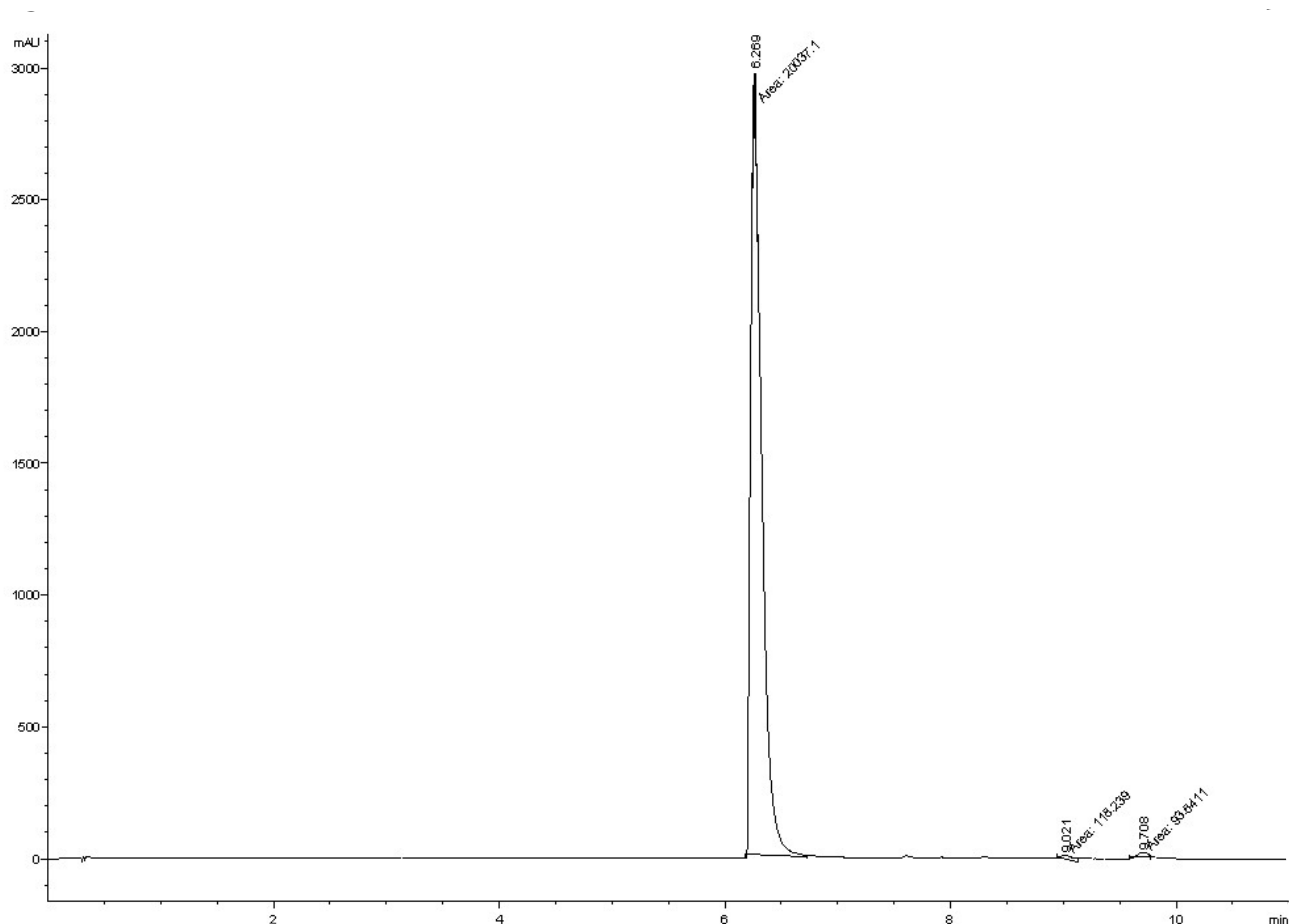


Fig. 15. HPLC of the valoneic acid dilactone reference standard

valoneic acid dilactone (**9**), ellagitannins with molecular weights of 934 Da and 936 Da.

The main components of the purified fraction 3 of tannins were pedunculagin (**4**) and praecoxin A (an isomer) (**5**) (Fig. 13). The resulting concentrate is promising for further isolation of these compounds required as standards for the study of their quantitative content in the Altabor substance.

A preparative method for valoneic acid dilactone isolation from the Altabor substance hydrolyzed in acidic conditions was also developed. It can be used to obtain a reference standard of this compound. The ^1H NMR spectrum of the valoneic acid dilactone isolated and its HPLC are shown in Fig. 14 and 15, respectively.

Experimental part

Equipment

The composition analysis was performed using an Agilent 1200 chromatograph with a UV detector, a G6140 mass detector; an Alltech 3300 light scattering detector (ELSD), as well as the Agilent ChemStation Rev.B.04.03 software.

The molecular weights of the compounds in the extract were determined using the method of mass spectro-

metry of ESI-electrospray ionization – a gentle ionization method that allowed obtaining molecular ion peaks of complex ellagitannin molecules without destroying them. Formic or trifluoroacetic acid should be used to ionize the molecules in the extract, as their use improves the resolution. One can also use ammonium acetate or ammonium formate.

The determination of the components was performed using an ultraviolet detector at a wavelength of 280 nm.

The column was Rapid Resolution HT Cartidge, 4.6×30 mm, $1.8 \mu\text{m}$, Zorbax SB-C18.

^1H NMR spectrum was taken with a Varian VNMRs 400 MHz spectrometer, using TMS as an internal standard in $\text{DMSO}-d_6$ solution.

Mobile phase systems

System I: (A) 0.1% HCOOH (aqueous solution), (B) CH_3CN . 0–1.5 min, 100% A (isocratic mode); 1.5–7.5 min, 0–20% B in A (linear gradient); flow-rate – 1 mL/min.

System II: (A) 0.05% CF_3COOH (aqueous solution), (B) CH_3CN . 0–1.5 min, 100% A (isocratic mode); 1.5–7.5 min 0–20% B in A (linear gradient); flow-rate – 1 mL/min.

System III: (A) 0.1% HCOOH , (B) CH_3CN . 0–1.5 min, 100% A (isocratic) 1.5–3 min, 0–5% B in A (linear

gradient); 3–4.5 min, 5% B (isocratic); 4.5–9 min, 5–20% B in A (linear gradient); flow-rate – 1 mL/min.

System IV: (A) 0.1% HCOOH (aqueous solution), (B) CH₃CN. 0–3 min, 100% A (isocratic); 1.5–7.5 min, 0–20% B in A (linear gradient); flow-rate – 1 mL/min.

Preparation of the methanol extract of the Altabor substance. The sample of the Altabor substance (6.0 g) was mixed with 120 mL of methyl alcohol for 3 h. The dark solution was filtered, and the solvent was evaporated in vacuum at a temperature below 40°C. A dark solid product was obtained. The yield was 4.2 g.

Fractionation of the Altabor substance with Diaion HP-20 sorbent. A column: inner diameter d = 1.5 cm, total volume v = 70 mL, the height of the sorbent column h = 25.5 cm, weight of the resin – 20 g. The Altabor substance (700 mg) was dissolved in 1.5 mL of distilled water with stirring. The solution was filtered and applied to the top layer of the sorbent. Elution of the column was carried out at a rate of 1.5 mL per minute. The first elution was carried out with pure water. Fraction 1 was collected in a volume of 110–120 mL. Then elution by 10%, 20%, 40%, 96% ethyl alcohol was successively carried out. Thus, fractions 2, 3, 4, 5 in volumes of 110–120 mL were collected. All fractions were evaporated in vacuum at 20 mmHg on a water bath with a temperature below 40°C.

Valoneic acid dilactone (reference standard). The Altabor substance (2 g) was dissolved in the ethyl alcohol-water mixture (1:2). Then 7 mL of the

concentrated hydrochloric acid were added to the solution, and it was refluxed for 4 h. After the resin was separated, the solvents were evaporated. As the result, a crystalline product, being preferably a mixture of valoneic acid dilactone and ellagic acid, was obtained. The resulting product (900 mg) was refluxed for 30 min in 10 mL of dioxane. The hot solution was filtered, while valoneic acid dilactone remained in the solution. The filtrate was left to crystallize. The precipitate was filtered. The procedure was repeated 3–4 times to obtain valoneic acid dilactone with a purity of more than 98% (HPLC control). The yield was 50 mg.

Conclusions

A new effective method of analysis of the Altabor substance has been developed; it allows determining the qualitative and quantitative content of its structural components. The method gives the possibility to control the process of obtaining the Altabor substance, study the dependence of its composition on the conditions of its obtaining, batch number, place, time of the natural raw material collection, and study the composition of other pharmaceutical substances, the plant raw material containing hydrolysable tannins. The advantage of the method is the short time (up to 10 min) of analysis using high-performance liquid chromatography at high resolution.

Conflict of interests: the authors have no conflict of interests to declare.

References

1. *Екофлора України*; Дідух, Я. П., Ред.; Фітосоціоцентр: Київ, 2004; Т. 2, 442–447.
2. Задорожний, А. М.; Кошкин, А. Г.; Соколов, С. Я.; Шретер, А. И. *Справочник по лекарственным растениям*; Лесная промышленность: Москва, 1981.
3. Рибалко, С. Л. Вивчення антивірусної активності препарату Альтабор на експериментальній моделі інфекції, спричиненої вірусом гепатиту С, в культурі клітин. *Вісник фармакології та фармації* **2010**, 3, 29–36.
4. Попова, О. І. Клінічна ефективність альтабору в комплексному лікуванні герпетичної інфекції порожнини рота. *Український медичний альманах* **2013**, 16 (1), 154–56.
5. Яковлева, Л. В.; Євдокімова, О. С. Альтан – новий препарат для лікування виразкової хвороби шлунково-кишкового тракту. *Вісник фармації* **1993**, 1-2, 96–103.
6. Сербин, А. Г.; Яковлева, Л. В.; Хворост, О. П.; Гладух, Е. В.; Комиссаренко, Н. Ф.; Бондарь, В. С.; Болотов, В. В.; Шаламай, А. С. Альтан – новое отечественное эффективное средство ранозаживляющего, противовоспалительного, антимикробного действия. *Провизор* **1998**, 18, 40–41.
7. Бойчук, О. П. Застосування фітопрепарату “Альтан” в комплексному лікуванні хворих на гострі кишкові інфекції на тлі супутньої патології органів травлення. *Галицький лікарський вісник* **2004**, 11 (2), 20–21.
8. Незгода, І. І.; Рикало, Н. А. (Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова). Спосіб лікування гострих кишкових інфекцій. Патент України 3317, 15.11.2004.
9. Рикало, Н. А. Ефективність фітопрепарату «Альтан» при експериментальному клесбієльозі. *Експериментальна і клінічна медицина* **2005**, 2, 41–44.
10. Лапковський, Е. Й. Застосування альтану і дицетелу для корекції біохімічних та імунологічних показників при хронічному некаменевому холециститі. *Клінічна та експериментальна патологія* **2004**, 4, 117–120.
11. Зупанец, І. А.; Герасименко, Е. В.; Шаламай, А. С.; Саенко, Т. В. Опыт применения препарата Альтабор в профилактике гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. *Здоров'я України* **2013**, 20, 43–45.
12. Ivanov, S. A.; Nomura, K.; Malfanov, I. L.; Ptitsyn, L. R. Glutinoin, a novel antioxidative ellagitannin from *Alnus glutinosa* cones with glutinoic acid dilactone moiety. *Natural Product Research* **2012**, 26 (19), 1806–1816. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.613387>.
13. Krutskikh, T. V.; Shalamay, A. S. Validation of the method of quantitative determination of the amount elagotannins in tablets Altabor. *Management, economy and quality assurance in pharmacy* **2015**, 3, 25–29.
14. Gryszczyńska, A.; Dreger, M.; Piasecka, A.; Kachlicki, P.; Witaszak, N.; Sawikowska, A.; Ożarowski, M.; Opala, B.; Łowicki, Z.; Pietrowiak, A.; Miklaś, M.; Mikołajczak Przemysław, Ł.; Wielgus, K. Qualitative and quantitative analyses of bioactive compounds from ex vitro *Chamaenerion angustifolium* (L.) (*Epilobium angustifolium*) herb in different harvest times. *Industrial Crops and Products* **2018**, 123, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.010>.

15. Liang, X.; Jiang, Y.; Guo, Z.; Fang, S. Separation, UPLC-QTOF-MS/MS analysis, and antioxidant activity of hydrolyzable tannins from water caltrop (*Trapa quadrispinosa*) pericarps. *LWT* **2020**, *133*, 110010. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110010>.
16. Grace, M. H.; Warlick, C. W.; Neff, S. A.; Lila, M. A. Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-IT-TOF-MS. *Food Chem.* **2014**, *158*, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.117>.
17. Regueiro, J.; Sánchez-González, C.; Vallverdú-Queralt, A.; Simal-Gándara, J.; Lamuela-Raventós, R.; Izquierdo-Pulido, M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *152*, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.158>.
18. Jia, X.; Luo, H.; Xu, M.; Zhai, M.; Guo, Z.; Qiao, Y.; Wang, L. Dynamic Changes in Phenolics and Antioxidant Capacity during Pecan (*Carya illinoensis*) Kernel Ripening and Its Phenolics Profiles. *Molecules* **2018**, *23* (2), 435. <https://doi.org/10.3390/molecules23020435>.

Received: 12. 05. 2020

Revised: 23. 01. 2021

Accepted: 15. 02. 2021

M. Ye. Blazheyskiy, O. V. Koval'ska, K. V. Dynnyk

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine
53, Pushkinska str., Kharkiv, 61002. E-mail: lena05021985@ukr.net

A novel luminol-based chemiluminescence method for detecting acetylcholine

Aim. To develop a new simple non-enzymatic method for the determination of acetylcholine (ACh) by the chemiluminescent reaction of luminol under conditions of the enzymatic hydrolysis of acetylcholine (pH 8.5).

Experimental part. The method proposed is based on the perhydrolysis reaction of ACh by the excess of hydrogen peroxide with the formation of peracetic acid. The latter was further determined by the activation effect of the luminol chemiluminescent oxidation reaction in the presence of hydrogen peroxide. The analytical signal was the summary luminescence (Σ) registered within certain time.

Results and discussion. The pH range of the analytically applicable system was from 8.2 to 8.5. The effect of ACh + H₂O₂ incubation period on the reaction progress was also studied. The increase of the incubation period enhanced the sensitivity of the method (the limit of detection (LOD)), but because of practical reasons (especially the detection speed) and practical experience the incubation period was set to 30 min. The linear dependence was observed in the acetylcholine chloride concentration range of $(0.8-2.8) \times 10^{-4}$ mol/L. While determining acetylcholine chloride in the concentration range of $(1.1-2.2) \times 10^{-4}$ mol/L the relative standard deviation (RSD) did not exceed 3% ($(\bar{X} - \mu) \times 100\% / \mu = -0.5...+0.5\%$). The Limit of Quantitation (LOQ, 10S) was 7.7×10^{-5} mol/L.

Conclusions. A new non-enzymatic kinetic method for the chemiluminescent determination of ACh in aqueous solutions and the pharmaceutical formulation Acetylcholinchlorid Injeel® has been proposed. This method is simple, fast, inexpensive, and thus appropriate for the routine ACh quality control in the laboratories of hospitals, pharmaceutical industries and research institutions.

Key words: acetylcholine; chemiluminescence method

М. Є. Блажеєвський, О. В. Ковальська, К. В. Динник

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Україна

Новий хемілюмінесцентний метод визначення ацетилхоліну з використанням люмінолу

Мета. Розробити новий простий неферментативний метод визначення ацетилхоліну (ACh) за допомогою хемілюмінесцентної реакції люмінолу за умов ферментативного гідролізу ацетилхоліну (pH 8,5).

Експериментальна частина. Запропонований спосіб засновано на реакції пергідролізу ацетилхоліну надлишком пероксиду водню з утворенням пероцтової кислоти. Пероцтову кислоту далі визначали за допомогою ефекту активації реакції хемілюмінесцентного окиснення люмінолу в присутності пероксиду водню. Аналітичним сигналом була сумарна люмінесценція (Σ) за певний час.

Результати та їх обговорення. Діапазон рН аналітично застосовної системи становив від 8,2 до 8,5. Додатково досліджено вплив інкубаційного періоду ACh+H₂O₂ на перебіг реакції. Збільшення інкубаційного періоду підвищило чутливість методу (межу виявлення (LOD)), але з практичних причин (особливо швидкості визначення) та практичного досвіду інкубаційний період було зафіксовано на рівні 30 хв. Лінійна залежність спостерігалась у діапазоні концентрацій ацетилхолін хлориду $(0,8-2,8) \times 10^{-4}$ моль/л. За визначення ацетилхолін хлориду в модельному розчині в межах концентрацій $(1,1-2,2) \times 10^{-4}$ моль/л відносно стандартне відхилення RSD не перевищувало 3% ($(\bar{X} - \mu) \times 100\% / \mu = -0,5...+0,5\%$). Межа кількісного визначення (LOQ, 10S) становила $7,7 \times 10^{-5}$ моль/л.

Висновки. Запропоновано новий неферментативний кінетичний метод для хемілюмінесцентного визначення ацетилхоліну у водних розчинах та фармацевтичному засобі Acetylcholinchlorid Injeel®. Цей метод є простим, швидким, недорогим і придатним для рутинного контролю якості ацетилхоліну в лабораторіях лікарень, фармацевтичної промисловості та науково-дослідних установ.

Ключові слова: ацетилхолін; хемілюмінесцентний метод

Copyright © 2021, M. Ye. Blazheyskiy, O. V. Koval'ska, K. V. Dynnyk

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Acetylcholine (ACh) (Fig. 1) is a neurohormone of the autonomic nervous system playing an important role in maintaining the vital functions of a living organism.

ACh was the first neurotransmitter to be characterized. It is the primary neurotransmitter in muscular synapses. In the central nervous system (CNS) it is associated with attention, learning, memory, consciousness, sleeping, and control of voluntary move-

ments [1]. Disruption of normal ACh signaling is implicated in Huntington's disease, Alzheimer's disease, schizophrenia, and Parkinson's disease [2], endarteritis, intermittent claudication, spasms of retinal arteries, intestinal and bladder atony. It is used to facilitate radiographic diagnosis of esophagus achalasia [3].

When the nerve impulse reaches the end of an axon, ACh is released transmitting the impulse further. This action of ACh is subsequently

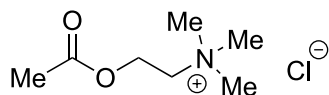


Fig. 1. Acetylcholine chloride

discontinued as a result of its hydrolysis catalyzed by the cholinesterase enzyme presented in living tissues (Scheme 1).

In order to study various disorders mentioned above and develop new medicines, it is important to measure the ACh concentration with simple, fast, inexpensive, and accurate methods.

For the quantitative determination of acetylcholine chloride the European Pharmacopoeia and US Pharmacopoeia use the method of acidimetry [4, 5]. According to the current analytical normative documentation, the content of the main substance is argentometrically determined by Folgard or LC [4]. The titrimetric procedures are highly accurate, but are not specific to ACh. A colorimetric method widely used in the practice of biological researches for determining ACh concentration was proposed by Hestrin [6].

Common procedures for ACh detection include the high-performance liquid chromatography (HPLC) method on microdialysis samples [7], electrochemical methods using potentiometric and amperometric sensors [8] and ion-sensitive field-effect transistors (ISFETs) [9].

HPLC on microdialysis samples has very high resolution in the pM range. However, this method has disadvantages, namely the tedious sample pretreatment and high cost (a microdialysis probe costs about \$200).

A simple, rapid and sensitive optical biosensor for detection of choline and ACh based on the hydrogen peroxide (H_2O_2)-sensitive quantum dots (QDs) was constructed. The detection limit for ACh was found to be $10\ \mu M$, and the linear range was $10\text{--}5000\ \mu M$. The wide linear ranges were shown to be suitable for routine analyses of choline and ACh. The detection linear range of ACh in the serum was $10\text{--}140\ \mu M$. The excellent performance of this biosensor showed that the method can be used in practice detection of choline and ACh. The performance of the device exceeds most reported ACh microsensors. However, the characteristic curve is not linear, and calibration is required for this device [10].

Ternaux and Chamoin described an enhanced chemiluminescence assay method for the determination of ACh [11]. In some methods ACh was hydrolyzed by acetylcholinesterase before the analysis [12]. Electron transfer and oxidation by hydrogen peroxide were

facilitated by immobilizing the enzyme on a redox polymer [13].

ACh is not electroactive, thus, it cannot be analyzed by electrochemical methods. Therefore, methods recently published for monitoring ACh involve either biosensor or MS detection. Biosensors were used for the direct detection of ACh or preceded by LC. A common biosensor scheme requires co-immobilization of acetylcholinesterase and choline oxidase. ACh is converted to choline, and choline is further oxidized by choline oxidase to produce hydrogen peroxide, which is detected. Since choline is a normal metabolite of ACh *in vivo*, another biosensor coated only with choline oxidase is often used together with the ACh biosensor to measure and subtract out the signal due to endogenously occurring choline. As with all biosensors or microelectrodes, major concerns are their selectivity and sensitivity in relation to a target molecule. Therefore, interfering electroactive species were excluded from ACh electrodes with permselective membranes composed of over oxidized poly(pyrrole)-poly(2-naphthol) films [14]. Carballo *et al* demonstrated liquid chromatography with the electrochemical detection (LC-EC) system using an electrode for the detection of ACh [15, 16].

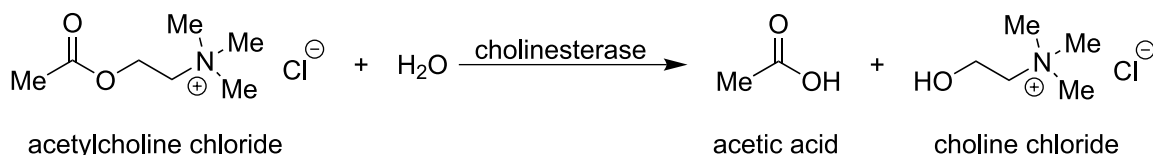
Those methods published for the determination of ACh by LC-MS in dialysate or cell culture samples sought rapid separations and a sensitive detection with the minimal ion suppression during ESI [17–19].

In some new enzymatic methods based on the use of two sequential reactions involving acetylcholinesterase and choline oxidase, the control of the content of hydrogen peroxide is carried out by the chemiluminescent method following the catalytic oxidation reaction of the chemiluminescent luminol indicator in the presence of the enzyme peroxidase [10, 12].

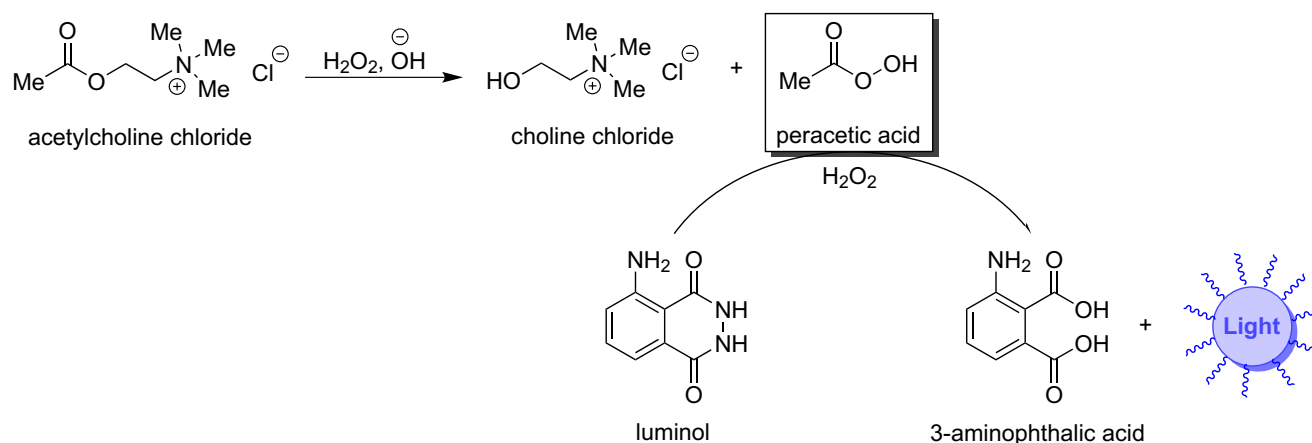
In this article a new kinetic-chemiluminescent method for the determination of acetylcholine chloride has been proposed. It is based on the application of a conjugated system of two successive reactions – ACh perhydrolysis and oxidation reaction of the chemiluminescence indicator luminol (H_2L) induced by peracetic acid formed at the first stage.

Peracetic acid formed as the result of ACh perhydrolysis reacts with luminol in the presence of hydrogen peroxide with the generation of chemiluminescence measured by the chemiluminescence method of the fixed time. The scheme of luminol oxidation is given in Scheme 2.

Based on the experimental data it was found that within the pH range of 8.2–8.5 the intensity of chemi-



Scheme 1. Acetylcholine hydrolysis



Scheme 2. The reaction scheme of ACh perhydrolysis and chemiluminescent oxidation of luminol

luminescence (emitted by oxidation of luminol with peracetic acid in the presence of hydrogen peroxide) was directly proportional to the concentration of ACh. The initial stage – ACh perhydrolysis – determined the rate of the whole process. The kinetic curves of chemiluminescence produced in the reaction of luminol with hydrogen peroxide in the presence of ACh are shown in Fig. 2.

Experimental Part

Acetylcholine chloride – 99% (Acros), argentometric titration – $\geq 98.5\%$ (on dried base); the loss on drying – $\leq 1.0\%$ (105°C, 3 h); the molecular formula – C₇H₁₆ClNO₂; the molecular weight – 181.66 g/mol.

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione, H₂L, Sigma-Aldrich, 97%) was additionally recrystallized from a saturated solution of sodium hydroxide. All other chemicals were of analytical grade. Solutions were prepared with double distilled water produced in a quartz water distiller.

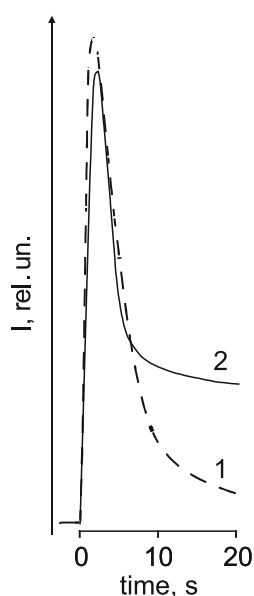


Fig. 2. The effect of ACh (ACh-luminol-H₂O₂, 2) on the intensity of chemiluminescence in the luminol-H₂O₂ (1) system for the reaction time of 20 sec, *w* (ACh): 1 – 0%; 2 – $1.5 \cdot 10^{-3}\%$; *c* (H₂L) = $5.0 \cdot 10^{-5}$ mol/L; *w* (H₂O₂) = $5.0 \cdot 10^{-2}\%$; pH 8.5

Acetylcholinchlorid Injeel® (Biologische Heilmittel Heel GmbH) – composition: 1 ampoule of 1.1 mL contains as an active ingredient acetylcholine chloratum 0.367 g (on dried base), ethanol 43% (w/w). Excipient: sodium chloride.

The stock solution of acetylcholine chloride ($2.75 \cdot 10^{-2}$ mol/L) was prepared daily and stored at 4°C. The analyte was weighed using a calibrated scale (model AG204, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland).

The experiment conditions used in the research were selected based on the literature sources [21–23].

Preparation of the Working Standard Solution of acetylcholine chloride, 5.07 mg/mL. Dissolve 0.50717 g of acetylcholine chloride reference standard *ex tempore* in degassed double distilled water to make 100.00 mL of solution. Store in a high-density polyethylene or polypropylene bottle at 4°C.

The content of ACh in the solution was controlled by argentometric titration [6]. Working solutions with a smaller amount of acetylcholine chloride were prepared daily by diluting accurately the stock solution.

Preparation of phosphate buffer, pH 8.5

To 250.0 ml of 0.2 mol/L solution of disodium phosphate add 8.0 mL of 0.1 mol/L of hydrogen chloride solution. The pH control was carried out potentiometrically using a glass electrode ELS-43-07 and I-130 ionomer.

Preparation of hydrogen peroxide solution, 5% (1.5 mol/L). Dissolve 16.5 g of 30% hydrogen peroxide in water in a 100 mL volumetric flask and dilute the solution to the volume with water. The content of hydrogen peroxide in the solution was controlled by the method of permanganometry.

Preparation of 0.01 mol/L stock solution of luminol in 0.01 mol/L solution of sodium hydroxide. Dissolve 0.1772 g of luminol in 100.0 mL of 0.01 mol/L solution of sodium hydroxide. Dilute the resulting solution of luminol 10 times with double distilled water.

The chemiluminescence intensity was measured using an assembled chemiluminescence installation (Chemiluminometer-01), including a FEU-84-A

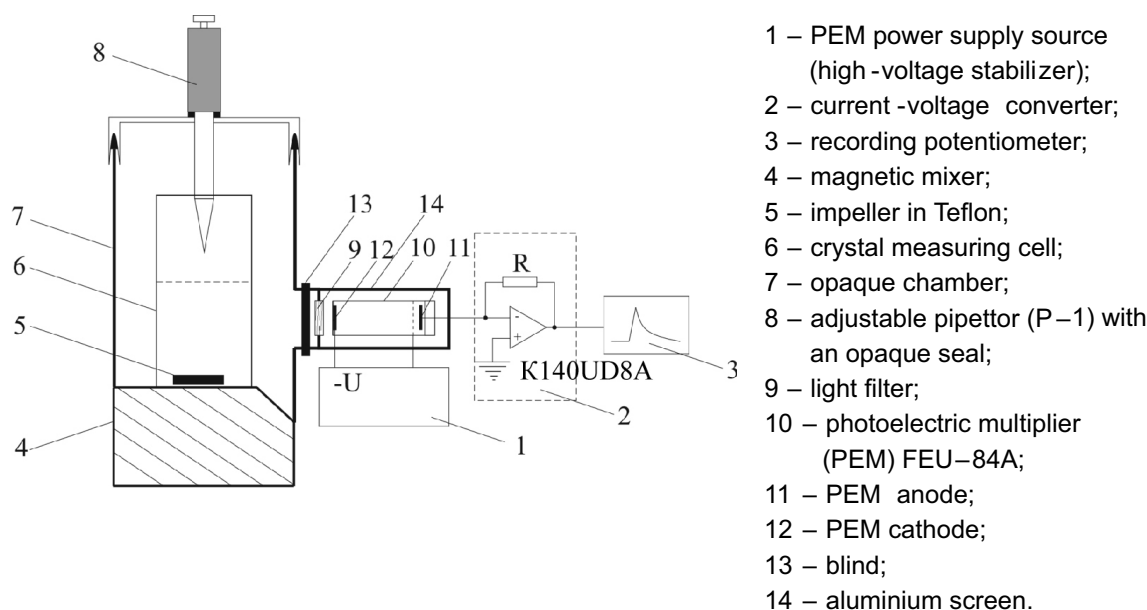


Fig. 3. The installation for measuring chemiluminescence

photoelectric-multiplier (PEM), a IMT-0.5 weak current meter and a LINE RECORDER TZ 4620 fast-operating recording potentiometer (Laboratorni pristroje, Czech Republic) (Fig. 3).

The procedure for the quantitative determination of acetylcholine by the chemiluminescence method. When studying the impact of the ACh concentration on chemiluminescence in the (ACh + buffer + H₂O₂) + H₂L system, an order of operations was as follows. A sample of the test solution of ACh (from 0.10 to 1.00 mL), 1.00 mL of 5% solution of hydrogen peroxide and (10 - Y) mL of 0.2 mol/L of the phosphate buffer solution (pH 8.5) (where «Y» is the total volume of all other components in the solution) were added into a flask with a lapped stopper, and all components were mixed thoroughly. The flask was left in the thermostat at 40°C for 15 min. Then 1.00 mL of the resulting mixture was taken and placed in a quartz cuvette, with stirring, 8.5 mL of phosphate buffer solution (pH 8.5) was added, and the cuvette was placed in a measuring cell of a chemiluminescent photometer. After that the curtain was opened and 0.5 mL of 1 × 10⁻³ mol/L of luminol solution was added to the cuvette. The total luminescence was recorded using an I-02 digital automatic integrator for 20 sec. The dependence of the chemiluminescence intensity on time (sec) was registered on the kinetic graph (Fig. 2). The experiment was repeated five times. The desired signal was the area under the curve – the integral of the chemiluminescence over time period (20 sec) (Σ, relative units (rel. un.)) obtained by averaging the values of five experiments. The sensitivity was 2 mV, and the chart speed was $v = 0.6$ cm/min. All experiments were conducted at 18 to 20°C. The content of acetylcholine was found on the calibration graph.

The control experiment was performed as follows: 9.0 mL of 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH 8.5)

and 1.0 mL of 5% solution of hydrogen peroxide were added to a 10 mL tube with a lapped stopper with stirring. 1.00 mL of the solution was introduced into the cuvette, stirred with 8.5 mL of phosphate buffer (pH 8.5), and the cell was placed in a chemiluminescent photometer. The curtain was opened, and the value of integral chemiluminescence was registered using an I-02 digital automatic integrator for 20 sec (Σ, rel. un.).

The method of obtaining the data for the calibration curve. In a tube with a lapped stopper, (10 - Y) mL of 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH 8.5) (where «Y» is the total volume of all other components in the solution), 1.00 mL of 5% solution of hydrogen peroxide and a sample of the test solution of ACh (0.10; 0.20; 0.40; 0.50; 0.70 and 1.00 mL) were added. The analysis was performed in the same way as when testing model solutions (see the procedure above).

Results and discussion

A series of experiments allowed us to determine the dependence of integral chemiluminescence (ΔΣ, rel. un.) on the concentration of ACh in the cell (c , mol/L) (Fig. 4). The linear dependence was observed on the acetylcholine chloride concentration range of $(0.8-2.8) \times 10^{-4}$ mol/L (Table 1).

The concentration of ACh was calculated using the following formula:

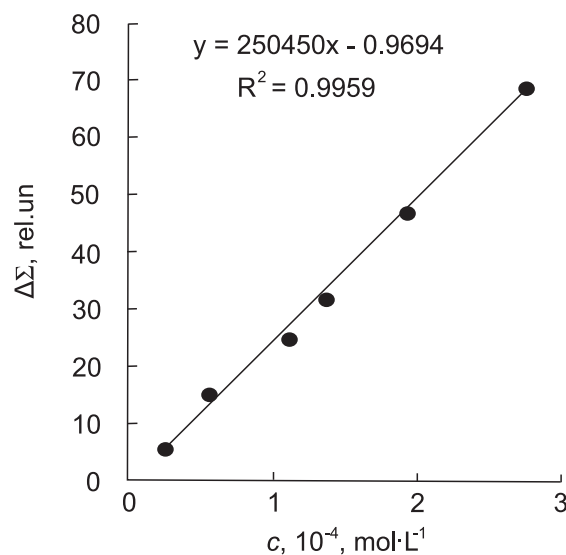
$$c = \frac{(\Delta\Sigma - a) \times 10 \times 10}{b \times V_a \times 1},$$

where: a – is the axis intersection of the calibration curve equation ($\text{tg}\alpha = bc + a$), rel. un.; b – is the slope of the calibration curve equation ($\text{tg}\alpha = bc + a$) – the coefficient of instrumental sensitivity, L/mol; ΔΣ – is the difference in values of integral chemiluminescence

Table 1

Regression output

Parameter	Data
Regression equation $y = a + bc$	$y = (250.4 \pm 31.2) \times 10^3 c$
Correlation coefficient (r)	0.998
S_a	1.931073
S_b	11273.28
a	-0.9694
b	250448
$\Delta a = S_a \times t_a$	5.36152
$\Delta b = S_b \times t_a$	31230
$LOD = 3S_d/b$	2.3×10^{-5} mol/L
$LOQ = 3.3 \times LOD$	7.7×10^{-5} mol/L

Fig. 4. The dependence of integral chemiluminescence ($\Delta\Sigma$, rel. un.) on the concentration of ACh in the cell (c , mol/L)

in the working and control (without ACh) experiments, in relative light units; V_a – is the volume of the sample solution taken for testing, mL; 10, 10 – is the dilution.

The results of determining acetylcholine chloride in model solutions by the chemiluminescence method using the reaction with hydrogen peroxide and luminol is presented in Table 2.

The procedure of the ACh assay in Acetylcholinchlorid Injeel® (Biologische Heilmittel Heel GmbH). The procedure was as follows: 1.00 mL solution contained in an ampoule of Acetylcholinchlorid Injeel® (Biologische Heilmittel Heel GmbH) (0.367 g (on dried base) in 1.1 mL) was quantitatively transferred into a 100 mL volumetric flask, and double distilled water was added to make 100 mL solution. The micropipettes were used to introduce a sample of the test solution of ACh prepared (1.00 mL), 1.00 mL of 5% solution of hydrogen peroxide and (10 – Y) mL of 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH 8.5) (where “Y” is the total volume of all other components of the solution) into a tube with a lapped stopper, and the content was mixed thoroughly. The analysis was performed in the same way

as when testing model solutions (see the procedure above “The procedure for the quantitative determination of acetylcholine by the chemiluminescence method”).

Accurately weighed 0.367 g of acetylcholine chloride reference standard was dissolved *ex tempore* in degassed double distilled water to make 100.00 mL of solution. The micropipettes were used to introduce a sample of standard solution of acetylcholine (1.00 mL), 1.00 mL of 5% solution of hydrogen peroxide and (10 – Y) mL of 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH 8.5) (where «Y» is the total volume of all other components of the solution) into a tube with a lapped stopper, and all the components were mixed thoroughly. The flask was left in the thermostat at 40°C for 15 min. 1.00 mL of the resulting mixture was collected and placed in a quartz cuvette, with stirring, 8.5 mL of phosphate buffer solution (pH 8.5) was added, and the cuvette was placed in a measuring cell of a chemiluminescent photometer. After the curtain opening 0.5 mL of 1×10^{-3} mol/L of luminol solution was added. The total luminescence was registered using an I-02 digital automatic integrator for 20 sec. The exper-

Table 2

The results of the acetylcholine chloride determination in model solutions by the chemiluminescence method using the reaction with hydrogen peroxide and luminol ($P = 0.95$, $n = 5$)

C taken, 10^{-4} mol/L	C found, 10^{-4} mol/L	Recovered, mol/L	RSD, %	δ , %
1.10	1.10; 1.06; 1.13; 1.07; 1.13	$(1.10 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	3.0	0%
1.38	1.43; 1.41; 1.36; 1.35; 1.37	$(1.38 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	2.5	0%
1.93	1.97; 1.93; 1.94; 1.89; 1.86	$(1.92 \pm 0.05) \times 10^{-4}$	2.3	-0.5%
2.20	2.15; 2.21; 2.26; 2.20; 2.25	$(2.21 \pm 0.055) \times 10^{-4}$	2.0	+0.45%

riming was repeated five times.

The control experiment was performed as it was mentioned above (see “Procedure for the quantitative determination of acetylcholine by the chemiluminescence method”).

The content of ACh (X (g) of a dried substance) in one ampoule was calculated by the following formula:

$$X = (\Delta\Sigma x \times m_{st} \times w_{st} \times V) / (\Delta\Sigma st \times 100 \times 1.00),$$

where: m_{st} – is the standard sample weight, g; w_{st} – is the content of anhydrous ACh, %; 1.00 – is the volume of the test solution taken for analysis, mL; V – is the average volume of the solution in ampoules, mL; $\Delta\Sigma x$ – is the difference in values of integral chemiluminescence in the working and control (without ACh) experiments in relative light units; $\Delta\Sigma st$ – is the difference in values of integral chemiluminescence in the standard solution and control (without ACh) experiment in relative light units.

The results of the ACh analysis in the pharmaceutical formulation Acetylcholinchlorid Injeel® (Biologische Heilmittel Heel GmbH) by the method proposed ($n = 7$, $P = 0.95$) are presented in Table 3.

From the results given above, we can conclude that this chemiluminescent method is a fast, simple and non-enzymatic approach for the quantitative determination of ACh in aqueous solutions; it is based on the reaction of perhydrolysis of ACh to peracetic acid and the subsequent chemiluminescent de-

Table 3

The results of ACh the analysis in the pharmaceutical formulation Acetylcholinchlorid Injeel® (Biologische Heilmittel Heel GmbH) by the method proposed ($n = 7$, $P = 0.95$)

Labelled amount, g/amp	Recovered \pm RSD, %	δ , %*
0.367	99.5 \pm 1.9%	-0.5%

Note: * $\delta = (\bar{X} - \mu) \times 100\% / \mu$

termination of its amount by the reaction of chemiluminescent oxidation of luminol. While determining acetylcholine chloride in the concentration range of $(1.1 - 2.2) \times 10^{-4}$ mol/L the relative standard deviation did not exceed 3% ($RSD \leq 3\%$, $((\bar{X} - \mu) \times 100\% / \mu = -0.5...+0.5\%)$). The limit of quantitation (LOQ, 10 S) was 7.7×10^{-5} mol/L.

Conclusions

A new non-enzymatic kinetic method for the chemiluminescent determination of acetylcholine in aqueous solutions and the pharmaceutical formulation Acetylcholinchlorid Injeel® has been proposed. This method is simple, fast, inexpensive, and thus appropriate for the routine acetylcholine quality control in the laboratories of hospitals, pharmaceutical industries and research institutions.

Conflict of interests: the authors have no conflict of interests to declare.

References

- Picciotto, M. R.; Higley, M. J.; Mineur, Yann S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* **2012**, *76* (1), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>.
- Berridge, M. J. Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia. *Prion* **2013**, *7* (1), 2–13. <https://doi.org/10.4161/pri.21767>.
- VIDAL. Справочник лекарственных средств. Acetylcholine chloride. <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1181> (accessed Dec 17, 2020).
- European Pharmacopoeia*, 9th Ed.; European Department for the Quality of Medicines: Strasbourg, 2016.
- The United States pharmacopeia USP35, the national formulary NF30*; United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2012.
- Hestrin, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.* **1949**, *180* (1), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56740-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56740-5).
- Uutela, P.; Reinilä, R.; Piepponen, P.; Ketola, R. A.; Kostianen, R. Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (20), 2950–2956. <https://doi.org/10.1002/rcm.2160>.
- Lin, S.; Liu, C.-C.; Chou, T.-C. Amperometric acetylcholine sensor catalyzed by nickel anode electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20* (1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.01.018>.
- Alfonta, L.; Katz, E.; Willner, I. Sensing of Acetylcholine by a Tricomponent-Enzyme Layered Electrode Using Faradaic Impedance Spectroscopy, Cyclic Voltammetry, and Microgravimetric Quartz Crystal Microbalance Transduction Methods. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (5), 927–935. <https://doi.org/10.1021/ac990439d>.
- Kharitonov, A. B.; Zayats, M.; Lichtenstein, A.; Katz, E.; Willner, I. Enzyme monolayer-functionalized field-effect transistors for biosensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, *70* (1), 222–231. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00573-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00573-6).
- Chen, Z.; Ren, X.; Meng, X.; Chen, D.; Yan, C.; Ren, J.; Yuan, Y.; Tang, F. Optical detection of choline and acetylcholine based on H₂O₂-sensitive quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *28* (1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.041>.
- Ternaux, J.-P.; Chamoin, M.-C. Enhanced chemiluminescent assays for acetylcholine. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1994**, *9* (2), 65–72. <https://doi.org/10.1002/bio.1170090205>.
- Fan, W.; Zhang, Z. Determination of Acetylcholine and Choline in Rat Brain Tissue by FIA with Immobilized Enzymes and Chemiluminescence Detection. *Microchem. J.* **1996**, *53* (3), 290–295. <https://doi.org/10.1006/mchj.1996.0043>.
- Şen, S.; Gülce, A.; Gülce, H. Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19* (10), 1261–1268. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.11.011>.
- Guerrieri, A.; Lattanzio, V.; Palmisano, F.; Zamboni, P. G. Electrosynthesized poly(pyrrole)/poly(2-naphthol) bilayer membrane as an effective anti-interference layer for simultaneous determination of acetylcholine and choline by a dual electrode amperometric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21* (9), 1710–1718. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.08.005>.
- Carballo, R.; Dall’Orto, V. C.; Rezzano, I. Poly[Ni(II)Protoporphyrin IX] Modified Electrode for Amperometric Detection of Acetylcholine (ACh) and Choline (Ch). *Anal. Lett.* **2007**, *40* (10), 1962–1971. <https://doi.org/10.1080/00032710701484343>.

17. Keski-Rahkonen, P.; Lehtonen, M.; Ihalainen, J.; Sarajärvi, T.; Auriola, S. Quantitative determination of acetylcholine in microdialysis samples using liquid chromatography/atmospheric pressure spray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (18), 2933–2943. <https://doi.org/10.1002/rcm.3162>.
18. Prokai, L.; Fryčák, P.; Stevens, S. M.; Nguyen, V. Measurement of Acetylcholine in Rat Brain Microdialysates by LC-Isotope Dilution Tandem MS. *Chromatographia* **2008**, *68* (1), 101–105. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0697-0>.
19. Zhang, M.-Y.; Hughes, Z. A.; Kerns, E. H.; Lin, Q.; Beyer, C. E. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitation of acetylcholine and related neurotransmitters in brain microdialysis samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44* (2), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.02.024>.
20. Schebb, N. H.; Fischer, D.; Hein, E.-M.; Hayen, H.; Krieglstein, J.; Klumpp, S.; Karst, U. Fast sample preparation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for assaying cell lysate acetylcholine. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1183* (1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.033>.
21. Kunec-Vajić, E.; Weber, K. Acetylcholine as an activator of oxidation reactions. *Experientia* **1967**, *23* (6), 432–433. <https://doi.org/10.1007/BF02142159>.
22. Kunec-Vajić, E. The activating action of acetylcholine and pilocarpine on the oxidation of luminol. *Experientia* **1973**, *29* (8), 1010–1012. <https://doi.org/10.1007/BF01930434>.
23. Morel, N.; Israel, M. Applications to the Study of Acetylcholine Release of the Choline Oxidase Acetylcholine Assay. In *Neurocytochemical Methods*, Calas, A.; Eugène, D., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1991; pp 169–182.

Received: 31. 01. 2021

Revised: 20. 02. 2021

Accepted: 23. 02. 2021

О. О. Михайленко¹, А. Г. Котов², Е. Е. Котова², **Л. М. Сіра¹**,
В. М. Ковальов¹, В. А. Георгіянц¹

¹ Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Україна, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: mykhailenko.farm@gmail.com

² Державне підприємство «Державний науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Україна

Розробка методик стандартизації приймочок крокусу посівного (шафран) для внесення у проєкт монографії Державної фармакопеї України

Крокус посівний (*Crocus sativus* L.) з родини Ірисові (*Iridaceae*) – лікарська та харчова рослина, яку нещодавно почали активно культивувати в Україні. Спеція «шафран» – це є приймочки з квітки крокусу, які проявляють широкий спектр фармакологічної активності завдяки своїм трьом основним біоактивним сполукам: кроцину, пікрокроцину та шафраналю. Якість цієї сировини регламентується різними нормативними документами, проте в Державній фармакопеї України (ДФУ) така стаття відсутня.

Мета. Провести порівняльний аналіз монографії «Saffron for homeopathic preparations» з European Pharmacopoeia (ЄФ) 9.0, «Safran. *Crocus stigma*» з Deutscher arzneimittel codex (DAC) та «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)» з ISO 3632 за показниками: опис, ідентифікація (мікроскопія та ТШХ), сторонні домішки, втрата в масі під час висушування, зола та кількісне визначення кроцину, пікрокроцину та шафраналю методом УФ-Вид-спектрофотометрії для з'ясування можливості гармонізації вимог національної законодавчої бази на приймочки крокусу з ЄФ, DAC та ISO. Результати аналізу будуть враховані для розробки монографії національної частини ДФУ «Крокусу посівного (шафран) приймочки».

Результати та їх обговорення. Проаналізовано показники якості приймочок крокусу та їх нормування, що визначено монографією ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632 на досліджувану сировину, виявлено певні відмінності щодо регламентованих показників якості сировини. Результати власних досліджень засвідчили, що зразки приймочок українського крокусу (шафран) відповідають усім зазначеним вимогам. Наведено результати макро- та мікроскопічного дослідження сировини; хроматографічне дослідження проведено відповідно до ЄФ 9.0 та DAC із використанням кроцину як стандартної речовини; кількісне визначення кроцину, пікрокроцину та шафраналю у 8 зразках приймочок крокусу проведено методом УФ-Вид-спектрофотометрії відповідно до ISO 3632. Запропоновано ввести такі значення питомого показника поглинання: для кроцину ($C_{44}H_{64}O_{24}$; М.м. 976,70) – не менше 180, для шафраналю ($C_{10}H_{14}O$; М.м. 150,22) – не менше 30, для пікрокроцину ($C_{16}H_{26}O_7$; М.м. 330,37) – не менше 60, у перерахунку на суху сировину.

Експериментальна частина. Для аналізу використовували висушені приймочки крокусу посівного (шафран), заготовлені у смт Любимівка, Херсонська обл., Україна (2016–2018), а також комерційні зразки шафрану з Марокко, Азербайджану, Іспанії. Проведено аналіз провідних НТД, що містять статті «Крокусу приймочки», серед них ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632. Проводили дослідження: опис зовнішнього вигляду цілих приймочок крокусу; втрата в масі під час висушування та масова частка летких сполук (105 °С, 16 год); масова частка загальної золи; вимірювання кількості пікрокроцину, шафраналю та кроцину проводили шляхом прямого зчитування поглинання 1% водного розчину приймочок за 257 нм, 330 нм та 440 нм, відповідно, за допомогою УФ-Вид-спектрофотометра.

Висновки. Проведено аналіз вимог до якості ЛРС – приймочок крокусу посівного за двома монографіями: ЄФ 9.0 «Saffron for homeopathic preparations», «Safran. *Crocus stigma*» з Deutscher arzneimittel codex та міжнародним стандартом якості ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)». Визначено основні критерії стандартизації приймочок крокусу. Запропоновано внести монографію до національної частини ДФУ «Крокусу посівного приймочки (шафран)» за такими вимогами: ідентифікація (макро- та мікроскопічні ознаки; тонкошарова хроматографія (кроцин); кількісне визначення (вміст кроцину, пікрокроцину, шафраналю), адаптоване до ISO 3632, яке проводиться методом УФ-Вид-спектрофотометрії; сторонні домішки; втрата в масі під час висушування; загальна зола.

Ключові слова: стандартизація; Державна фармакопея України; крокусу посівного приймочки; шафран; кроцини

О. О. Mykhailenko¹, А. Г. Kotov², Е. Е. Kotova², **L. M. Sira¹**,
V. M. Kovalyov¹, V. A. Georgiants¹

¹ National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine

² State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Centre for Quality of Medicinal Products", Ukraine

Development of methods for standardization of *Crocus sativus* (saffron) stigmas for inclusion in the draft monograph of the State Pharmacopoeia of Ukraine

Crocus sativus L. from the Iridaceae family is a medicinal and edible plant that has recently been actively cultivated in Ukraine. Saffron spice is crocus flower stigmas exhibiting a wide range of the pharmacological activity due to its three main bioactive compounds: crocin, picrocrocic and safranal. The quality of this raw material is regulated by various normative documents, but there is no monograph in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPHU).

Aim. To perform a comparative analysis of the monograph “Saffron for homeopathic preparations” from the Ph. Eur. 9.0, “Saffron. Croci stigma” from the Deutscher arzneimittel codex (DAC) and “Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)” from the ISO 3632 by the following indicators: description, identification (microscopy and TLC), impurities, loss on drying, total ash and quantification of crocin, picrocrocin and safranal by UV-Vis-spectrophotometry to clarify the possibility of harmonizing the requirements of the national legal framework for *Crocus* stigmas with the Ph. Eur. 9.0, DAC and ISO 3632. The results of the analysis will be taken into account in the development of the monograph of the national part of the SPhU “*Crocus* stigmas (saffron)”.

Results and discussion. The quality indicators of *Crocus* stigmas and their standardization determined by the monograph in the Ph. Eur. 9.0, DAC and ISO 3632 on the raw material studied have been analyzed; some differences in the regulated quality indicators of the raw material have been found. The results of our own research have shown that the samples of the Ukrainian *Crocus* (saffron) meet all these requirements. The results of the macro- and microscopic examination of the raw material are given. The chromatographic examination has been performed in accordance with the Ph. Eur. 9.0 and DAC using crocin as a standard compound; the quantitative determination of crocin, picrocrocin and safranal in 8 samples of *Crocus* stigmas has been performed by UV-Vis-spectrophotometry in accordance with the ISO 3632. It has been proposed to introduce the following indicators to determine the specific absorption rate: for crocin ($C_{44}H_{64}O_{24}$; Mw – 976.70) not less than 180, for safranal ($C_{10}H_{14}O$; Mw – 150.22) – not less than 30, for picrocrocin ($C_{16}H_{26}O_7$; Mw – 330.37) – not less than 60 calculated with reference to the dried raw material.

Experimental part. For analysis the dried stigmas of *Crocus sativus* (saffron) collected in the village Lyubimivka, Kherson region, Ukraine (2016-2018), as well as commercial samples of saffron from Morocco, Azerbaijan, Spain were used. The analysis of the leading normative documents containing monographs “*Crocus* stigmas”, among them the Eur. Ph. 9.0, DAC and ISO 3632, was performed. The studies included description of the appearance of the whole *Crocus* stigmas; loss on drying and the mass fraction of volatile compounds (105°C, 16 h); the mass fraction of total ash. The amount of picrocrocin, safranal and crocin was measured by direct reading of the absorption of 1% aqueous solution of stigmas at 257 nm, 330 nm and 440 nm, respectively, using a UV-Vis-spectrophotometer.

Conclusions. The analysis of the requirements to quality of the medicinal raw material – stigmas of *Crocus sativus* – has been performed based on the monographs: “Saffron for homeopathic preparations” from the Ph. Eur. 9.0, “Saffron. Croci stigma” from the Deutscher arzneimittel codex and “Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)” from the ISO 3632. The main criteria for standardization of the raw material have been determined. It has been proposed to introduce the monograph to the national part of the SPhU “*Crocus* stigmas (saffron)” according to the following requirements: identification (macro- and microscopic signs; thin-layer chromatography (crocin)); the quantitative determination (the content of crocin, picrocrocin and safranal) adapted to the ISO 3632, performed by UV-Vis-spectrophotometry; impurities; loss on drying; total ash.

Key words: standardization; State Pharmacopoeia of Ukraine; *Crocus sativus* stigma; saffron; crocin

Copyright © 2021, O. O. Mykhailenko, A. G. Kotov, E. E. Kotova, L. M. Sira, V. M. Kovalyov, V. A. Georgiants
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Crocus L. є одним із родів родини Ірисові (*Iridaceae*), що налічує близько 80 видів [1]. Найбільш дослідженим, розповсюдженим та введеним у культуру є *Crocus sativus* L. (крокус посівний), прийомки якого широко використовують у харчовій промисловості як барвну та ароматизувальну спецію. 2015 року почалось масове культивування шафрану у Херсонській області України [2].

Наразі тривають дослідження шафрану з метою з'ясування можливості його використання як компонента протиракових, протизапальних та антидепресантних лікарських засобів [3]. Шафран використовують у китайській медицині для лікування меланхолії, депресії, шоку та порушень менструального циклу [4]; як адаптоген в індійській аюрведичній медицині [5]; у гомеопатії застосовують у випадках судомного кашлю, спастичних явищ у дітей [3, 4]. Приймочки крокусу посівного містять кілька характерних вторинних метаболітів, зокрема каротиноїди кроцетин та кроцин, а також монотерпеноїдний глікозид пікрокроцин та шафраналь (рис. 1) [1–3]. Крім того, виявлено наявність різних фенольних сполук, терпеноїдів, амінокислот, вітамінів [3, 6], які зумовлюють фармакологічну активність рослинної сировини. На світовому ринку наявні різні види додаткового хар-

чування на основі шафрану, серед них: «Affron»® Saffron Extract (Pharmactive, Canada) [7]; «Dry saffron extract «Saffron'Extr»® (Eusano, France, Germany) [8]; «Saffr'Activ»® (Green Plants Extracts, Australia) [9] та інші.

Аналіз сучасного стану науково-технічної документації (НТД) на цей вид лікарської рослинної сировини (ЛРС) засвідчив, що монографії на прийомки крокусу посівного (шафран) є у всіх провідних фармакопєях світу: Європейська Фармакопєя (ЄФ) 9.0 “Saffron for homeopathic preparations. Croci stigma ad praeparationes homoeopathicas”, 2014 [10]; Британська Фармакопєя “Saffron for Homoeopathic Preparations”, 2009 [11]; Німецька Фармакопєя “Crocus. Safran”, 2003 [12]; Deutscher arzneimittel codex (DAC) “Safran. Croci stigma”, 1999 [13]; Аюрведична Фармакопєя Індії, “Kumkuma (Style and stigma)”, 2015 [14]; Тайваньська Фармакопєя 2nd Ed. «Crocus stigma», 2016 [15]; Японська Фармакопєя 17nd Ed. «Crude Drugs Saffron», 2016 [16]; Китайська Фармакопєя “Stigma Croci. Xihonghua”, 2005 [17]; міжнародний стандарт ISO 3632 Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.), Geneva, Switzerland, 2010/2011 [18–19]; FDA PART 73 – Listing of color additives exempt from certification Subpart A – Foods. Sec. 73.500 Saffron [20]; ГОСТ 21722-84 «Шафран, технические

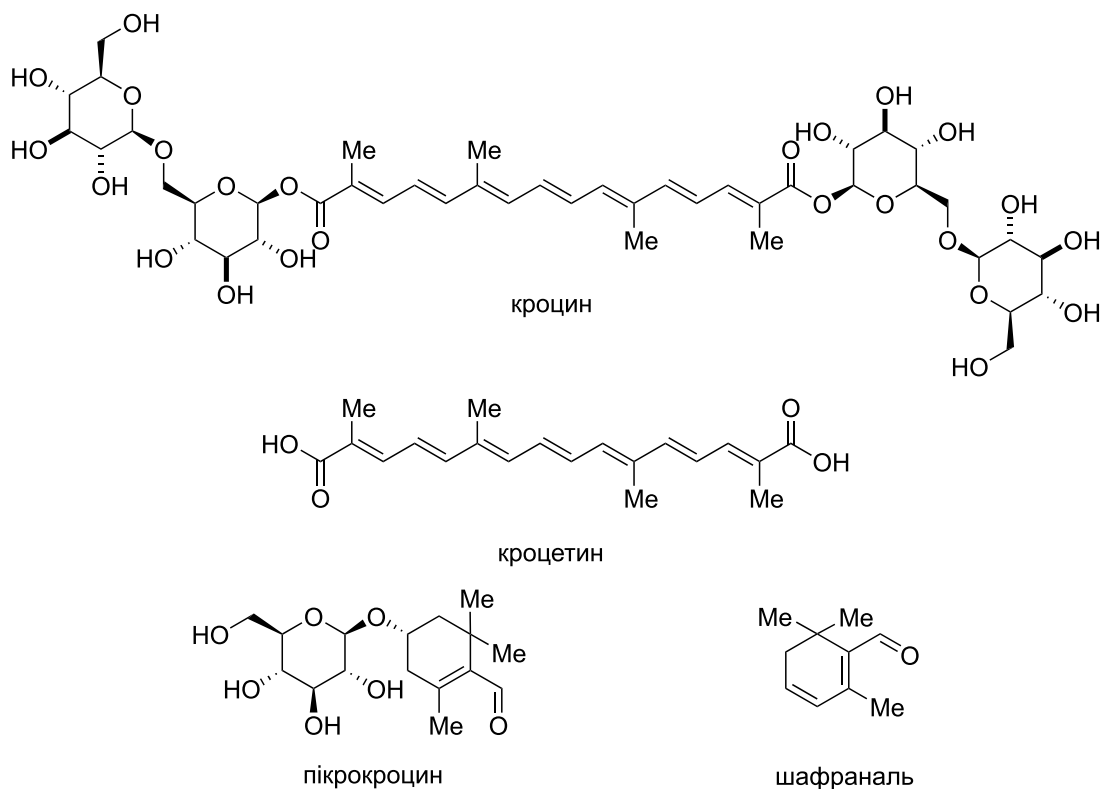


Рис. 1. Структурні формули основних біологічно активних речовин приймочок крокусу посівного: кроцин, кроцетин, пікрокроцин та шафраналь

условия», Москва, РФ, 2011 [21]; Doc. No. FAD 9(2516)C Draft Indian Standard Spices — Saffron (*Crocus sativus* L.), 2010/2011 [22]; National Iranian Standards 259-1: Saffron – specifications and 259-2: Saffron-test methods, 1996 [23]. Проте варто зауважити, що всі НТД регламентують використання шафрану по-різному – як гомеопатичний лікарський засіб, як лікарську рослинну сировину чи як харчовий засіб.

Отже, на сьогодні існує широкий спектр підходів до стандартизації шафрану, зумовлений вмістом основних біологічно активних речовин (БАР), а тому розробка єдиних методик стандартизації як сировини, так і препаратів на її основі є актуальною. Для верифікації методик показників якості шафрану було обрано монографії ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632 для розробки проєктів монографій на рослинну сировину приймочок крокусу посівного. З огляду на те, що досліджувану сировину описано в ЄФ 9.0, DAC та інших НТД, але не описано в Державній фармакопеї України (ДФУ), метою роботи було проведення аналізу методик якісного та кількісного визначення БАР приймочок крокусу з урахуванням вимог ДФУ для розробки монографії національної частини «Крокусу посівного (шафран) приймочки».

Експериментальна частина

Для проведення дослідження було взято 8 серій приймочок шафрану: зразки серій №1–5 заготовлено у смт Любимівка, Херсонська обл., Україна

(у жовтні 2016–2018), зразки серій №6–8 придбано у відомих світових виробників шафрану – Марокко (м. Таліоуїн), 2017 р.; Азербайджан (м. Абшерон), 2017 р.; Іспанія (м. Ла-Манш), 2017 р. (зразки не фальсифіковані, куплені у відомих фермерів).

Проведено аналіз вимог до якості приймочок крокусу посівного за двома монографіями: «Saffron for homeopathic preparations» з ЄФ 9.0, «Safran. *Crocus stigma*» з DAC та міжнародним стандартом якості ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)», що було обрано за основу для розробки та впровадження монографії «Крокусу посівного (шафран) приймочки» до ДФУ.

Морфолого-анатомічне дослідження. Препарати з цілих та подрібнених сухих приймочок крокусу готували шляхом фіксування сировини у суміші спирт-гліцерин-вода (1:1:1). Як проявлювальний розчин використовували воду дистильовану, розчин хлоралгідрату Р (80 г/100 мл води) та розчин 50% (об/об) гліцерину Р [24]. Реактив на крохмаль – розчин Люголя. Морфологічні та анатомічні діагностичні ознаки вивчали й описували за загальноприйнятими методами і вимогами ДФУ [25], використовували мікроскоп РВ-2610 (збільшення 15x10, 15x40) і фотокамеру Samsung PL50.

Тонкошарова хроматографія. Для аналізу використовували методику ідентифікації кроцинів, що наведено у ЄФ 9.0 за статтею «Ідентифікація С» [10]: для приготування випробуваного розчину брали наважку сировини 0,01 г, обережно

розтирали у ступі товчачиком перед випробуванням та додавали 0,05 мл води Р. Через 3 хв додавали 1 мл метанолу Р, витримували впродовж 20 хв у захищеному від світла місці та фільтрували. Хроматографування проводили на пластинках Merck 60 F₂₅₄, у системі розчинників вода Р – 2-пропанол Р – етилацетат Р (10:25:65). Як розчин порівняння використовували 5,0 мг нафтолу жовтого S R та 5 мг судану червоного G R, що розчиняли у 5 мл метанолу Р. Отримані хроматограми висушували на повітрі, після чого переглядали за денного світла (виявлення А), потім переглядали пластинки в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм (виявлення В). Виявлення С: пластинку обприскували анісового альдегіду розчином Р, нагрівали за температури 100–105°C протягом 5–10 хв і переглядали за денного світла.

Кількісне визначення. Для дослідження використано методику вимірювання оптичного поглинання випробовуваного водного розчину приймочок крокусу за 440 нм з ЄФ 9.0 відповідно до статті «Випробування. Інтенсивність забарвлення» [10] та методику ISO 3632 [19] оцінки вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцину відповідно до статті «Визначення основних характеристик методом УФ-Вид-спектроскопії» у водному розчині приймочок крокусу. Визначення пікрокроцину, шафраналю та кроцинів ($A_{1\text{ см}}^{1\%}(\lambda_{\text{max}})$) для кожного зразка розраховували за формулою:

$$A_{1\text{ см}}^{1\%}(\lambda_{\text{max}}) = \frac{(A \times 10000)}{m \times (100 - W)},$$

де: А – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 257 нм для пікрокроцину, 330 нм для шафраналю, 440 нм для кроцину; 10000 – повне розведення витягу, m – маса наважки випробовуваної сировини, г; W – втрата в масі під час висушування випробовуваної сировини, %. Екстракти аналізували за допомогою спектрофотометра Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer (США). Статистичне оброблення даних проводили відповідно до вимог ДФУ, 1-е вид., доп. 1, п. 5.3, використовуючи програмне забезпечення Microsoft Office Excel 7.0 [25].

Результати та їх обговорення

Для здійснення поставленого завдання у Херсонській області у 2016–2018 рр. було заготовлено зразки приймочок крокусу посівного. На момент виконання дослідження в інших регіонах України цю рослину не вирощували, тому для порівняння якості шафрану українського походження до аналізу було залучено зразки приймочок, заготовлені в Марокко, Азербайджані та Іспанії, де виробництво шафрану існує декілька століть.

У монографії ЄФ 9.0. наведено критерії стандартизації приймочок крокусу, що запропоновано

використовувати як гомеопатичний засіб. Водночас у DAC наведено монографію «Safran. Croci stigma» саме на лікарську рослину сировину, а настанова Міжнародної організації зі стандартів ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)» регламентує процедури визначення якості приймочок для харчової промисловості. Тому для обґрунтування розробки та впровадження проекту монографії до національної частини ДФУ «Крокусу посівного (шафран) приймочки» саме як лікарської рослини сировини для порівняння методів визначення якості було обрано названі нормативні документи.

Досліджуючи критерії стандартизації та регламентації показників якості, наведені у зазначених вище документах, виявили певні розбіжності, що при цьому суттєво доповнюють одна одну. У таблиці 1 наведено результати аналізу досліджуваних зразків українського шафрану та порівняння вимог, що висуваються до сировини приймочок крокусу у ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632: ідентифікація А та В (макро- та мікроскопія сировини); ідентифікація С (ТШХ), а також випробування (сторонні домішки; сторонні барвники, ТШХ, втрата в масі під час висушування; загальна зола та кількісне визначення).

Ідентифікація А. Макроскопія. Під час проведення макроскопічних досліджень серій приймочок крокусу було з'ясовано, що досліджувана сировина відповідає вимогам монографій ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632.

Ідентифікація В. Мікроскопія. Дослідження проводять для подрібненої сировини. У ході мікроскопічних досліджень у всіх зразках виявлено діагностичні анатомічні структури, характерні для приймочок крокусу посівного (рис. 2, таблиця 1).

Ідентифікація С. Тонкошарова хроматографія. Ідентифікацію кроцинів у сировині проводили методом ТШХ відповідно до вимог DAC та ЄФ. На рис. 3 наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину приймочок крокусу та розчину порівняння. За денного світла (виявлення А) на хроматограмі розчину порівняння зверху виявляється червона зона судану червоного G, у нижній третині виявляється жовта зона нафтолу жовтого S. На хроматограмі випробовуваного розчину в нижній третині нижче стандарту проявляється одна жовта зона та вище неї – дві жовті зони. У середній третині може бути видно до двох блідо-жовтих зон. Зона з найменшим значенням R_f (кроцин) має найбільшу інтенсивність, що перевищує інтенсивність зони нафтолу жовтого S. На хроматографі випробовуваного розчину (виявлення В) видно темну зону в переході від нижньої до середньої третини та у верхній третині. За виявлення С на хроматограмі випробовуваного розчину в нижній половині проявляється синьо-зелена зона (кроцин), над нею – дві синьо-зелені

Таблиця 1

Результати дослідження приймочок крокусу посівного на відповідність вимогам ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632

Показник	Вимоги ЄФ 9.0	Вимоги DAC	Вимоги ISO 3632*	Отримані результати, що рекомендовано впровадити у монографію
1	2	3	4	5
Ідентифікація А. Макроскопія	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Цілі сухі червоно-бурі приймочки зі стовпчиками завдовжки 15–40 мм. Стовпчики зрослі, утворюють нитку (ніжку), у якій вирізняється біла основа і блідо-жовта трубка. Трубка стовпчиків поступово доверху дещо стовщується, розгалужується певною мірою і несе 3 вільних, червоно-оранжевих вузько-лійкоподібних приймочки завдовжки до 5 мм з хвилястим, нерівномірно-зубчастим краєм
Ідентифікація В. Мікроскопія	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Клітини епідерми із злегка звивистими бічними стінками і невеличкими сосочкуватими виростами зовнішньої оболонки (рис. 1, a); по краю з видовженими сосочкоподібними виростами (б). Пилкові зерна відокремлені (в), жовті, симетричні, монадні, кулясті, сфероїдальні чи сплюснено-сфероїдальні діаметром 80–100 мкм, з дрібнозернистою екзину. Пігментовані клітини епідерми і паренхіми приймочок (г) містять водорозчинний вміст (кרוцини). Провідні пучки містять вузькі судини зі спіральними потовщеньнями (д). Крохмальні зерна прості, кулясті або овальні (е)
Втрата в масі під час висушування, %	Не більше 10,0% (до постійної маси)	Не більше 12,0% (105°C, 2 год)	Не більше 12,0% (105°C, 16 год)	Не більше 12,0%; 0,200 г сировини перед випробуванням перемелюють у ступці, сушать за 105°C протягом 2 год
Масова частка загальної золи, %	Не більше 7,0%	Не більше 7,0%	Не більше 8,0%	Не більше 7,0%
Масова частка золи, що нерозчинна в 10% хлоридній кислоті, %	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не більше 1,0% – категорія I та II*; не більше 1,5% – категорія III, IV	Не застосовувати. Зола, нерозчинна у хлористоводневій кислоті, складається в основному з оксиду кремнію і характеризує забрудненість сировини сторонніми мінеральними домішками. Спосіб оброблення приймочок [26] виключає їх потрапляння
Визначення вмісту квіткових відходів	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не більше 0,5% – категорія I; не більше 3% – категорія II; не більше 5% – категорія III, IV	Об'єднати у статтю «Сторонні домішки»
Масова частка подрібнених приймочок, що проходять крізь сито з отворами 500 мкм (0,5 мм)	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не більше 6,0%	Об'єднати у статтю «Сторонні домішки»

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5
Масова частка сторонніх домішок рослинного та нерослинного походження	Мають бути відсутні повністю	Не більше 7,0%	Не більше 0,1 та 0,5% – категорія I, II; не більше 1,0 та 2,0% – категорія III, IV	Не більше 1%, при цьому стовпчиків допускається не більше 10,0% від загальної маси сировини, крім того, мають бути відсутні тичинки сафлору, квітки календули, чорнобривців, штучно пофарбовані кукурудзяні волокна. Мають бути відсутні анілінові барвники
Розчинність сировини у холодної воді, %	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не менше 65%	Не застосовувати. Зазначена вимога є лише для харчового засобу, що визначає ступіть розчинності, для ЛРС значення має вміст БАР
Чистота (якісні реакції)	Стаття відсутня	На хр-мі розчину ніяких жовтих, помаранчевих чи червоних зон не повинно бути, окрім зазначених у статті	Стаття відсутня	На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманого в розділі <i>Ідентифікація С</i> , ніяких жовтих, помаранчевих чи червоних зон не повинно бути видно за денного світла, окрім зон кроцину. Може бути блідо-жовта зона між лінією старту та зоною з найменшим значенням R_f . Цей залишок («хвіст») не враховується під час оцінювання
Ідентифікація С (ТШХ/ якісні реакції/ВЕРХ)	R_f (кроцин), забарвлення/денне світло/УФ 254 та 365 нм/обробка анісовим альдегідом. Стандарт: нафтол жовтий+судан червоний. Вода-2-пропанол-етилцетат (10:25:65)	R_f (кроцин), забарвлення / денне світло/УФ 254 нм. Стандарт: нафтол жовтий. Вода-2-пропанол-етилцетат (10:25:65)	ТШХ та/або ВЕРХ: штучні барвники мають бути відсутні	Послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та інші зони подано на рис. 2.
Визначення інтенсивності забарвлення	Значення оптичної густини має становити не менше 0,44 (кроцини λ_{\max} 440 нм)	Водний роз-н шафрану має бути забарвленим не менше, ніж розчин калій дихромату (0,5 г/л)	Значення оптичної густини має становити не менше 0,20 (кроцини λ_{\max} 440 нм)	Наявність відповідного забарвлення випробовуваного розчину відповідно до вимог ДАС
Кількісне визначення	Стаття відсутня	Стаття відсутня	S_{\max} (вміст пікрокроцинів λ_{\max} 257 нм) \max/\min 70 – 30; S_{\max} (вміст шафранало λ_{\max} 330 нм) \max/\min 50 – 20; S_{\max} (вміст кроцинів забарвлення λ_{\max} 440 нм) \max/\min 190 – 80	Кількісне визначення. Інтенсивність забарвлення, гіркоти, аромату за вимогами ISO 3632 (рис. 4). За визначенням питомого показника поглинання: для кроцину ($C_{44}H_{64}O_{24}$; М.м. 976,70) – не менше 180, для шафранало ($C_{10}H_{14}O$; М.м. 150,22) – не менше 30, для пікрокроцину ($C_{16}H_{26}O_7$; М.м. 330,37) – не менше 60, у перерахунку на суху сировину

* Якість шафрану оцінюють від I до IV категорії, з яких I – III найкращі і IV найбідніші.

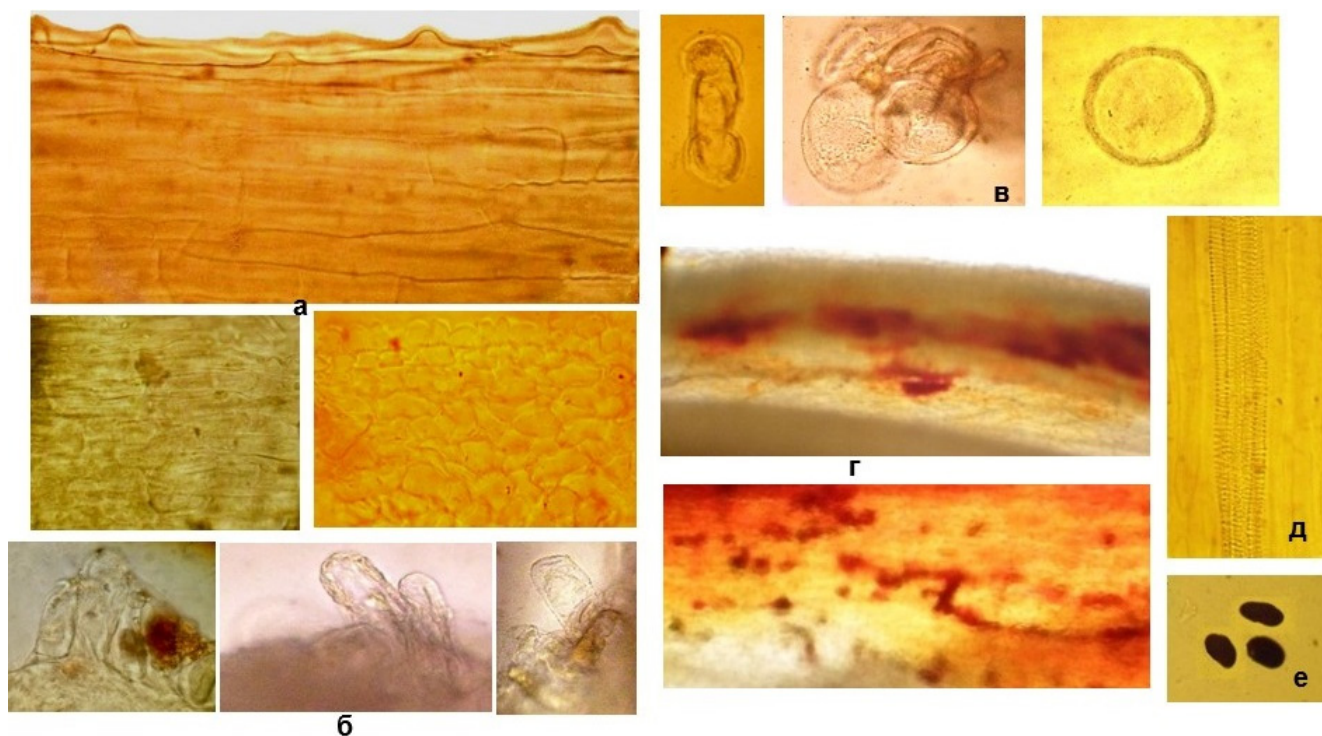


Рис. 2. Анатомо-діагностичні ознаки цілих приймочок шафрану, де: **а** – епідерма поверхні приймочок з сосочками; **б** – край приймочки з сосочкоподібними й пальчастими виростами; **в** – пилкові зерна; **г** – пігментовані клітини епідерми і паренхіми приймочок; **д** – спіральні судини ксилеми стовпчика і приймочки; **е** – крохмальні зерна (після дії розчину Люголя)

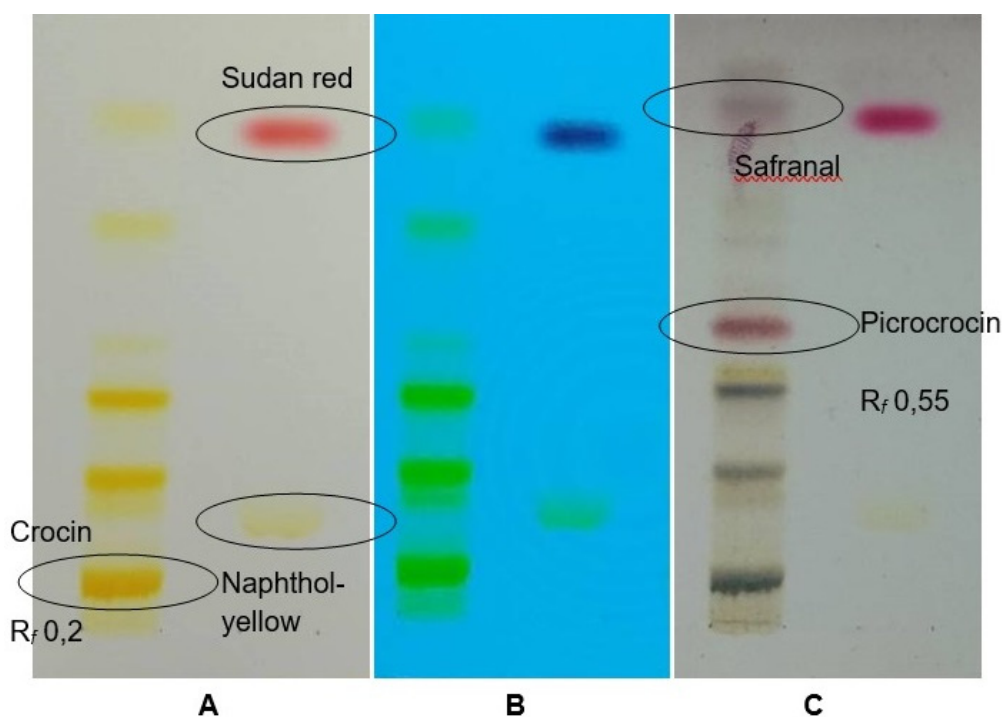


Рис. 3. Хроматограми випробовуваних розчинів приймочок крокусу посівного (шафран): **А** – переглядають за денного світла; **В** – в УФ-світлі за 254 нм; **С** – після обприскування розчином анісового альдегіду і за денного світла після нагрівання за 100–105 °С протягом 5–10 хв

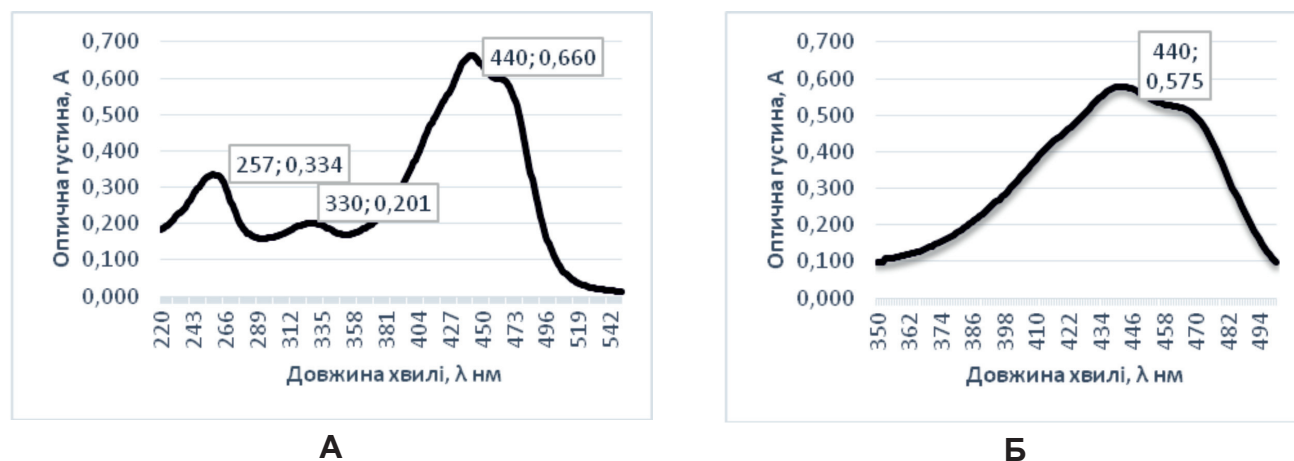


Рис. 4. Типові УФ-спектри поглинання випробовуваних розчинів приймочок крокусу посівного: **А** – отриманий в умовах методики ISO 3632; **Б** – отриманий в умовах методики ЄФ 9.0

Таблиця 2

Результати визначення кількісного вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцинів у розчинах приймочок крокусу посівного відповідно до методики ISO 3632, ($x \pm \Delta x$), $P = 0,95$; $\mu = 5$

Номер серії	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 257 нм Пікрокроцин (смак)	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 330 нм Шафраналь (аромат)	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 440 нм Кроцини (колір)
№1	73,63 ± 1,30	43,54 ± 0,77	158,66 ± 2,79
№2	69,04 ± 1,21	35,38 ± 0,62	153,29 ± 2,70
№3	81,23 ± 1,43	31,72 ± 0,56	221,04 ± 3,89
№4	87,81 ± 1,54	35,38 ± 0,62	245,52 ± 4,31
№5	90,40 ± 1,59	37,76 ± 0,66	248,11 ± 4,36
№6	94,15 ± 1,66	36,96 ± 0,65	208,52 ± 3,67
№7	57,62 ± 1,01	38,48 ± 0,66	49,30 ± 0,87
№8	77,74 ± 1,37	55,52 ± 0,98	133,03 ± 2,34

зони, над ними – зона від червоного до червоно-фіолетового кольору і у верхній половині – одна або дві блідо-червоно-фіолетові зони. На хроматограмі розчину порівняння у верхній частині виявляється малиново-червона зона судану червоного G, а під нею – жовта зона нафтолу жовтого S. Варто зауважити, що екстракти шафрану дуже добре розділяються, зони мають характерну жовту флуоресценцію, з чітким визначенням R_f . Зони стандартів порівняння розташовані дуже високо (див. зразки хроматограм), навіть не на рівні з визначуваною речовиною – кроцином (R_f 0,15–0,25) та пікрокроцином (R_f 0,55).

Кількісне визначення. У роботі використано дві методики для порівняння результатів. У ЄФ 9.0 проводять визначення оптичної густини (інтенсивності забарвлення) водного витягу приймочок крокусу методом УФ-Вид-спектрофотометрії за 440 нм у перерахунку на кроцини. Відповідно

до методики ISO 3632, кількісне визначення пікрокроцину, кроцинів та шафраналю, виражених як поглинання 1% водного розчину приймочок за 257 нм, 330 нм та 440 нм відповідно, проводять тим же методом. Порівняння запропонованих методик засвідчило, що тільки у ISO 3632 наведено визначення питомого показника поглинання для кроцинів за довжини хвилі 440 нм (інтенсивність забарвлення), для шафраналю за довжини хвилі 330 нм (аромат), для пікрокроцину за довжини хвилі 257 нм (гіркота), за якими визначають кількісний вміст компонентів; у ЄФ визначають лише показник поглинання кроцинів за 440 нм, що має становити не менше 0,44, при цьому не обчислюють кількісний вміст речовини. У DAC відповідна стаття відсутня зовсім. На рис. 4 (А та Б) наведено типові УФ-спектри випробуваного розчину шафрану відповідно до методик ISO 3632 та ЄФ 9.0.

Оптимальним є використання методики кількісного визначення основних сполук за допомогою спектрофотометричного аналізу відповідно до ISO 3632, де пікрокроцин, шафраналь та кроцини виражають смак або гіркоту, аромат та забарвлення відповідно. Ці значення визначають як пряме зчитування поглинання 1% водного розчину висушених приймочок за 257, 330 та 440 нм у кварцевій кюветі з товщиною шару 1 см (табл. 2).

У результаті для розробки (у національну частину монографії) методики кількісного визначення біологічно активних речовин запропоновано визначати вміст пікрокроцину, шафраналю та кроцину за методикою ISO 3632: вимірювання проводять методом адсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях. За результатами досліджень визначено відповідні значення питомого показника поглинання: для кроцину – не менше 180, для шафраналю – не менше 30, для пікрокроцину – не менше 60, у перерахунку на суху сировину. Обрані речовини впли-

вають як на якість сировини, так і на фармакологічну дію ЛРС.

Висновки

Проведено аналіз вимог до якості ЛРС – приймочок крокусу посівного за двома монографіями: «Saffron for homeopathic preparations» з ЄФ 9.0, «Safran. *Crocus stigma*» з ДАС та міжнародним стандартом якості ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)». Визначено основні критерії стандартизації приймочок крокусу. Запропоновано внести монографію до національної частини ДФУ «Крокусу посівного приймочки (шафран)» за такими вимогами: ідентифікація (макро- та мікроскопічні ознаки); тонкошарова хроматографія (кроцин); кількісне визначення (вміст кроцину, пікрокроцину, шафраналю), адаптоване до ISO 3632, яке проводять методом УФ-Вид-спектрофотометрії; сторонні домішки; втрата в масі під час висушування; загальна зола.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

- Ahrazem, O.; Rubio-Moraga, A.; Nebauer, S.G.; Molina, R.V.; Gómez-Gómez, L. Saffron: Its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2015**, *63*, 8751–8764. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03194>.
- Михайленко, О. О.; Ковальов, В. М.; Кречун, А. В. *Оптимальні умови вирощування харчової та лікарської рослинної сировини приймочок шафрану (*Crocus sativus* L.) в Україні*; Інформаційний лист № 376-2018. Укрмедпатентінформ МОЗ України: Київ, 2018; Випуск 49 з проблеми «Фармація».
- Mykhailenko, O.; Kovalyov, V.; Goryacha, O.; Ivanauskas, L.; Georgiyants, V. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry* **2019**, *162*, 56–89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.004>.
- Cardone, L.; Castronuovo, D.; Perniola, M.; Cicco, N.; Candido, V. Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Scientia Horticulturae* **2020**, *272*, 109560–109563. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.1095605>.
- Khare, C. P. *Indian Medicinal Plants*. Springer-Verlag: New York, 2007.
- Gohari, A. R.; Saeidnia, S.; Mahmoodabadi, M. K. An overview on Saffron, Phytochemicals, and Medicinal Properties. *Pharmacognosy Review* **2013**, *7* (13), 61–66. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112850>.
- Kell, G.; Rao, A.; Beccaria, G.; Clayton, P.; Inarejos-García, A.M.; Prodanov, M. Affron® a novel saffron extract (*Crocus sativus* L.) improves mood in healthy adults over 4 weeks in a double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine* **2017**, *33*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2017.06.001>.
- Eusano GmbH & Co. KG. Saffron extract. <http://www.eusano.com/botanical-raw-materials-and-extracts/saffron-crocus-sativus/35-saffron-extract> (accessed Dec 11, 2020).
- SaffrActiv®. <http://www.saffractiv.com/> (accessed Nov 25, 2020).
- European Pharmacopoeia*, 9th Ed.; European Department for the Quality of Medicines: Strasbourg, 2014; Vol. 1, p. 1694.
- Materials for use in the Manufacture of Homeopathic Preparations; "Saffron for Homeopathic Preparations". *British Pharmacopoeia*; Crown: London, 2009; Vol. III, p. 7603.
- Crocus. Safran. German Homeopathic Pharmacopoeia*; CRC Press, 2003; Vol. 1, p. 547.
- Deutscher Arzneimittel-Codex/Neues Rezeptur-Formularium (DAC/NRF). Ergänzungsbuch zum Arzneibuch, Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ABDA)*; Govi-Verlag, 2016.
- Kumkuma (Style and stigma). *Ayurvedic Pharmacopoeia of India*; CreateSpace Independent Publishing Platform, 2015; Part I, Vol. IV, p. 59.
- Crocus stigma. Taiwan Herbal Pharmacopoeia*, 2nd Ed.; English Version; Ministry of Health and Welfare; 2016, p. 315.
- Crude Drugs Saffron. *Japanese Pharmacopoeia* (JP17), 17th Ed.; English Version; The Ministry of Health, Labour and Welfare; 2016, p. 173.
- Stigma Croci. Xihonghua. Chinese Pharmacopoeia*; 2005, p. 310–311.
- ISO 3632-1:2011; Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1: Specification (2 Ed.); International Organization for Standardization: Genève, 2011.
- ISO 3632-2:2010; Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 2: Test methods (1 Ed.); International Organization for Standardization: Genève, 2010.
- FDA PART 73 – Listing of color additives exempt from certification Subpart A – Foods. Sec. 73.500 Saffron.
- ГОСТ 21722-84; *Межгосударственный стандарт «Шафран, технические условия»; Москва, 2011.*

22. Doc. No. FAD 9(2516)C Draft Indian Standard Spices — Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 2 Test Methods [(first revision of IS 5453 (Part 2)] (Adoption of ISO 3632 - 2 : 2010). Doc. No. FAD 9(2515)C Draft Indian Standard Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 1 : Specification [third revision of IS 5453 (Part 1)] (Adoption of ISO 3632 - 1 : 2011).
23. National Iranian Standards 259-1: Saffron – specifications and 259-2: Saffron – test methods.
24. Барыкина, Р. П.; Веселова, Т. Д.; Девятков, А. Г.; Джалилова, Х. Х.; Ильина, Г. М.; Чубатова, Н. В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы; Издательство МГУ: Москва, 2004.
25. Державна фармакопея України, 1-е вид.; ПІРЕГ: Харків, 2001.
26. Mykhailenko, O.; Desenko, V.; Ivanauskas, L.; Georgiyants, V. Standard operating procedure of Ukrainian saffron cultivation according with Good Agricultural and Collection Practices to assure quality and traceability. *Industrial Crops and Products* **2020**, *151*, 112376–112387 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112376>.

Received: 05. 10. 2020

Revised: 01. 12. 2020

Accepted: 03. 12. 2020

У. А. Умаров¹, С. В. Колісник¹, О. В. Колісник¹, М. Фатхуллаєва²,
Н. К. Чінібекова², М. М. Хамдамов³

¹ Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Україна
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: ulugbekumarov08@gmail.com

² Ташкентський фармацевтичний інститут, Узбекистан

³ ТОВ Науковий центр стандартизації лікарських засобів, Узбекистан

Вивчення поліфенольних сполук трави анісу звичайного та визначення їхньої антиоксидантної активності

Мета. Вивчити якісний склад та кількісний вміст поліфенольних сполук трави анісу звичайного та визначити рівень їхньої антиоксидантної активності.

Результати та їх обговорення. З-поміж поліфенольних сполук, що містяться в траві анісу звичайного, переважає хлорогенова кислота (4,409 мг/г). Також у траві накопичуються значні кількості катехінів (3,104 мг/г), похідних апігеніну (3,077 мг/г) та лютеоліну (1,864 мг/г). У мінорних кількостях присутні рутин (0,189 мг/г), похідні мірицетину (0,105 мг/г), кверцетин (0,028 мг/г), похідні нарингеніну (0,019 мг/г), апігенін (0,009 мг/г) та гесперетин (0,002 мг/г). За результатами дослідження визначено, що антиоксидантна активність поліфенольних сполук трави анісу звичайного, виміряна щодо аскорбінової кислоти, становить $67,76 \pm 0,05$ ммоль/г, для рутину антиоксидантна активність склала $3979,59 \pm 0,08$ ммоль/г.

Експериментальна частина. Для аналізу використовували траву анісу звичайного, заготовлену в період цвітіння влітку 2019 року в Харківській області, Україна. Аналіз 70% етанольної витяжки трави анісу звичайного проводили методом високоефективної рідинної хроматографії за допомогою хроматографічної системи Prominence LC-20 Shimadzu (Японія) зі спектрофотометричним детектором SPD-20AV, колонка Agilent Technologies Microsorb-MV-150 (обернено-фазова, C18 модифікований силікагель, довжина 150 мм, діаметр 4,6 мм, розмір зерен сорбенту 5 мкм). Ідентифікацію речовин у витяжці проводили шляхом порівняння часу утримування і спектральних характеристик досліджуваних речовин з аналогічними характеристиками стандартів. Антиоксидантну активність визначали потенціометричним методом (рН-метр – Hanna 2550, з редокс-електродом EZDO PO50) щодо аскорбінової кислоти.

Висновки. Методом високоефективної рідинної хроматографії визначено якісний склад та кількісний вміст поліфенольних сполук в етанольному екстракті трави анісу звичайного. Сумарний вміст поліфенольних сполук склав 17,576 мг/г. Виявлено, що антиоксидантна активність етанольного екстракту трави анісу звичайного щодо активності аскорбінової кислоти становить $67,76 \pm 0,05$ ммоль/г.

Ключові слова: поліфенольні сполуки; аніс звичайний; трава; високоефективна рідинна хроматографія; антиоксидантна активність

U. A. Umarov¹, S. V. Kolisnyk¹, O. V. Kolisnyk¹, M. Fatkhullaeva², N. K. Chinibekova²,
M. M. Khamdamov³

¹ National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine

² Tashkent Pharmaceutical Institute, Uzbekistan

³ Ltd. Scientific Center for Standardization of Medicines, Uzbekistan

The study of polyphenolic compounds of *Pimpinella anisum* herb and determination of their antioxidant activity

Aim. To study the qualitative composition and quantitative content of the polyphenolic compounds in *Pimpinella anisum* herb and determine their antioxidant activity.

Results and discussion. Among the polyphenolic compounds contained in anise herb, chlorogenic acid (4.409 mg/g) predominates. Significant amounts of catechins (3.104 mg/g), apigenin derivatives (3.077 mg/g) and luteolin (1.864 mg/g) also accumulate in the herb. Minor amounts of myricetin (0.105 mg/g) and naringenin (0.019 mg/g) derivatives, rutin (0.189 mg/g), quercetin (0.028 mg/g), apigenin (0.009 mg/g) and hesperetin (0.002 mg/g) are present. According to the research results, the antioxidant activity of polyphenolic compounds of anise herb with reference to ascorbic acid was found to be 67.76 ± 0.05 mmol/g. Rutin exhibited the antioxidant activity at the level of 3979.59 ± 0.08 mmol/g.

Experimental part. *Pimpinella anisum* herb collected during the flowering stage in the summer of 2019 in the Kharkiv region (Ukraine) was used for analysis. The analysis of 70% ethanolic extract from anise herb was performed by high performance liquid chromatography using a Prominence LC-20 Shimadzu chromatographic system (Japan) with a SPD-20AV spectrophotometric detector, an Agilent Technologies Microsorb-MV-150 column (reversed-phase, C18 modified silica gel, length – 150 mm, diameter – 4.6 mm, particles size – 5 μm). Identification of substances in the extract was carried out by comparing the retention time and the spectral characteristics of the test substances with the same characteristics of the reference standards. The antioxidant activity was determined by the potentiometric method (pH meter – Hanna 2550, with redox electrode EZDO PO50) with reference to ascorbic acid.

Conclusions. The qualitative composition and quantitative content of polyphenolic compounds in the ethanolic extract of anise herb have been determined by high performance liquid chromatography. The total content of polyphenolic compounds is 17.576 mg/g. The antioxidant activity of polyphenolic compounds of anise herb with reference to ascorbic acid has been found to be 67.76 ± 0.05 mmol/g.

Key words: polyphenolic compounds; anise; herb; high performance liquid chromatography; antioxidant activity

Рід Бедринець охоплює 170–180 видів рослин, поширених по всій земній кулі, його вважають найбільшим у родині селерових (Ariaceae) [1]. Одним із видів цього роду є аніс звичайний (*Pimpinella anisum* L.), що росте у Єгипті, Південній Європі і який широко культивують у Туреччині, Південній Африці [2]. Плоди анісу досить добре вивчено і виявлено, що вони містять гідроксикоричні кислоти, флавоноїди [3], багатоатомні спирти, вуглеводи, глікозиди [4]. У насінні цієї рослини виявлено жирні кислоти [5], у коренях – кумарини і стероли [6]. В ефірній олії було ідентифіковано 49 сполук, серед яких домінують *транс*-анетол і *O*-ацетилізоевгенол [7].

Аніс використовують у традиційній медицині як вітрогінний та відхаркувальний засіб [8]. Ефірну олію зовнішньо застосовують для лікування шкірних захворювань [9], *in vitro* вона проявляє антимікробну активність щодо збудника харчових отруєнь людини та одного зі збудників газової гангрени *C. perfringens* [10]. Доведено, що етанольний екстракт плодів анісу чинить антиоксидантну та протизапальну дію [11], тоді як водний екстракт насіння анісу може викликати гіпотензію і брадикардію [12].

Поліфенольні сполуки як вторинні метаболіти є компонентами захисту рослин від комах і мікроорганізмів [13, 14]. За результатами фармакологічних досліджень доведено, що поліфенольні сполуки виявляють антиоксидантну [15], протизапальну [16], антиангіогенну [17], антиметастатичну [18] активності.

Плоди й ефірна олія анісу звичайного входять до Державної фармакопеї України, вони є достатньо вивчені, проте дані про вміст біологічно активних сполук у траві цієї рослини мають розрізнений характер, а вивченню поліфенольних сполук трави і їх антиоксидантної активності не приділено уваги з боку дослідників. З огляду на це видається актуальним дослідження якісного складу, кількісного вмісту й антиоксидантної активності поліфенолів з трави анісу звичайного.

Результати та їх обговорення

Методологічно ідентифікацію речовин в екстракті проводили шляхом порівняння часу утримування і спектральних характеристик досліджуваних речовин з аналогічними характеристиками набору стандартів відповідно до способу ідентифікації поліфенолів, що описано в статті [19]. Для точної ідентифікації або визначення приналежності досліджуваних речовин до конкретних груп поліфенолів використовували такі стандарти: хлорогенова і кавова кислоти (гідроксикоричні кислоти); катехін (катехіни); мірицетин, кверцетин і рутин (флавоноли); нарингенін, нарингін, гесперидин і гесперетин (флавонони); лютеолін і апігенін (флавонони);

дайдзеїн, геністеїн і геністин (ізофлавонони); ціанідин (антоціани) (Sigma-Aldrich, Німеччина).

Як спектральні характеристики речовин (h) використовували висоти піків цих речовин на хроматограмах за довжин хвиль 255, 286 і 350 нм щодо висоти піка за довжини хвилі 225 нм:

$$h_{255} = \frac{H_{255}}{H_{225}}, h_{286} = \frac{H_{286}}{H_{225}}, h_{350} = \frac{H_{350}}{H_{225}},$$

де: H_{225} , H_{255} , H_{286} , H_{350} – висоти піків за 225, 255, 286, 350 нм; h_{255} , h_{286} , h_{350} – відносні висоти піків за 255, 286, 350 нм.

Наведені довжини хвиль є середніми значеннями максимумів поглинання світла в ультрафіолетовій області для використаних у дослідженні стандартів, відомості про які було взято з джерел [20–22]. Для ідентифікації речовин розраховували такі індекси подібності між досліджуваною речовиною і стандартом за формулами:

$$I_T = 1 - |T_{st} - T_u|$$

$$I_{255} = 1 - |h_{255st} - h_{255u}|$$

$$I_{286} = 1 - |h_{286st} - h_{286u}|$$

$$I_{350} = 1 - |h_{350st} - h_{350u}|,$$

де: I_T – індекс подібності часу утримування; T_{st} – час утримування стандарту (хв); T_u – час утримування досліджуваної речовини (хв); I_{255} , I_{286} , I_{350} – індекси подібності спектральних характеристик; h_{255st} , h_{286st} , h_{350st} – спектральні характеристики стандарту; h_{255u} , h_{286u} , h_{350u} – спектральні характеристики досліджуваної речовини. Найменший з трьох за значенням індекс подібності спектральних характеристик визначав ступінь подібності (I_L) речовини і стандарту за цими характеристиками. Що вищий I_L , то більша ймовірність точної ідентифікації речовини. Такий метод дозволяє з високою точністю ідентифікувати сполуки в разі їх відповідності за часом утримування одночасно декільком стандартам, і навпаки – виявити різні форми певного поліфенолу (глікозиди та аглікони), які мають схожі спектральні характеристики [19].

Критерієм точної відповідності досліджуваної речовини якому-небудь стандарту було прийнято величини I_L і I_T не нижче 0,7. Речовини, подібні за спектральними характеристиками до будь-якого стандарту, але відмінні за індексом I_T , у цій роботі розглядали як речовини, що належать до тієї ж групи поліфенолів, що і цей стандарт. При цьому, якщо пік досліджуваного флавоноїду формується раніше від піка стандарту-аглікону, то такі речовини ідентифікують як глікозиди цього аглікону, а їх вміст розраховують за калібрувальними залежностями наявного стандарту будь-якого глікозиду цього аглікону. Наприклад, вміст невідомого

глікозиду нарингеніну визначали за калібруванням нарингеніну, а вміст невідомих глікозидів флавонолів – калібруванням за рутином (як глікозидної форми кверцетину).

Речовини, ступінь подібності яких зі стандартом катехіну був не нижче 0,7 і піки цих речовин розташовувалися в діапазоні між піком катехіну і найбільш раннім піком флавоноїду, ідентифікували як катехіни. Решту подібних до катехіну речовин зараховували до групи катехіноподібних поліфенолів.

Речовини, ступінь подібності яких з будь-яким стандартом був нижче 0,7, зараховували до групи неідентифікованих поліфенолів і їх вміст визначали за стандартами, ступінь подібності з якими був найбільший. Також як неідентифіковані поліфеноли визначали речовини, що мають ступінь подібності зі стандартами флавоноїдів вище 0,7 і піки яких на хроматограмах розташовувалися за межами діапазону піків стандартів флавоноїдів, які використовували в цьому дослідженні. Речовини, що не поглинали світло за довжини хвилі 225 нм, також вважали неідентифікованими та такими, що не належать до поліфенолів, їх у цій роботі не враховували.

На рис. 1 наведено хроматограму екстракту з трави анісу звичайного. Детектування піків речовин на виході з хроматографічної колонки проводили УФ-детектором за довжини хвилі 255 нм. Загалом на хроматограмах екстракту трави анісу звичайного ідентифіковано 88 піків, що їх було проаналізовано за індексами подібності до стандартів, які використовували у цьому дослідженні; з них 24 було зараховано до групи «неідентифіковані». На хроматограмі позначено основні піки, номе-

ри яких збігаються з номерами ідентифікованих речовин у таблиці.

Відповідно до описаного раніше алгоритму та на основі високих індексів подібності зі стандартними речовинами I_T та I_L сполуки №5 та №19 ідентифіковано як хлорогенову кислоту та кверцетин. Речовину №15 ідентифіковано як рутин з огляду на її високе значення індексу подібності часу утримування (I_T) зі стандартом рутину; низька схожість спектральних характеристик може бути зумовлена домішкою сторонніх речовин, які формують разом із рутином пік №15 на хроматограмі. Крім того, в екстракті виявлено похідні мірицетину, апігеніну та лютеоліну, які ідентифіковано як глікозидні форми цих агліконів через високу схожість спектральних характеристик та менші значення часу утримання проти стандарту, як було зазначено раніше. Також в екстракті присутні похідні гідроксикоричних кислот та катехіни.

Кількісний вміст поліфенольних сполук етанольного екстракту трави анісу звичайного розраховували на 1 г сухого зразка трави. Виявлено, що з поліфенольних сполук в екстракті переважає хлорогенова кислота (4,409 мг/г), яка є одним із найпоширеніших фенолпропанолів серед метаболітів рослин; суму гідроксикоричних кислот визначено на рівні 1,221 мг/г. Також у траві накопичуються значні кількості катехінів (3,104 мг/г), похідних апігеніну (3,077 мг/г) та лютеоліну (1,864 мг/г). Вміст рутину й похідних мірицетину виявлено на рівні 0,1–0,2 мг/г, у мінорних кількостях присутні кверцетин (0,028 мг/г), похідні нарингеніну (0,019 мг/г), апігенін (0,009 мг/г) та гесперетин (0,002 мг/г). Загальний вміст поліфенолів визначали як суму вмісту флавоноїдів, неідентифікованих

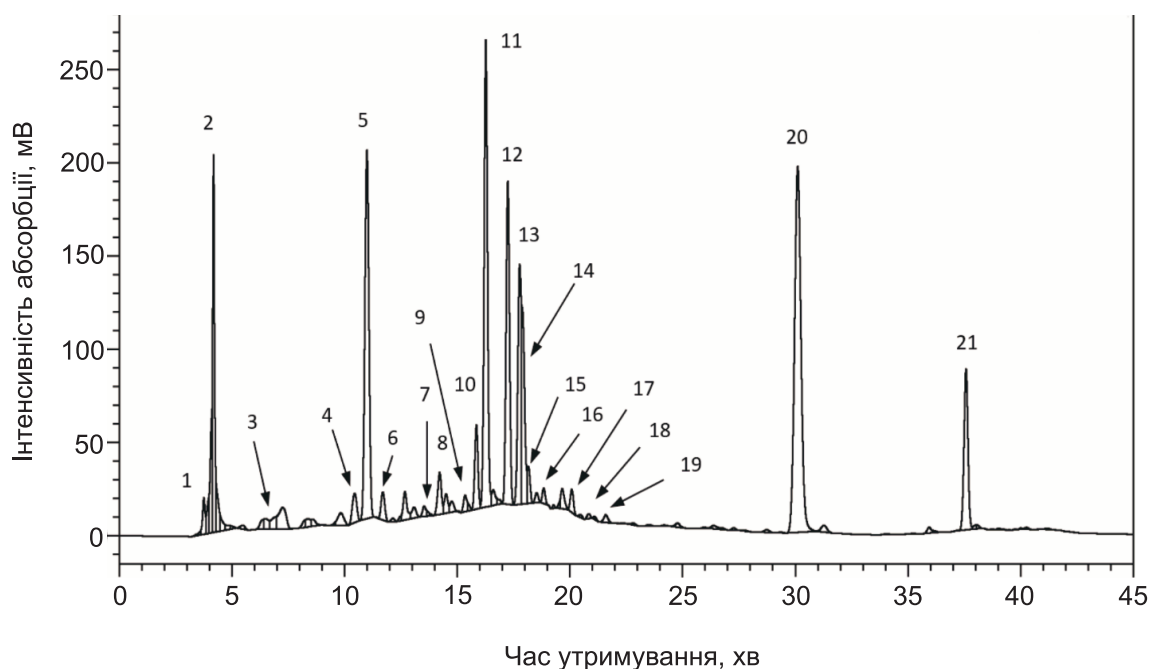


Рис. 1. Хроматограма спиртового екстракту зразка трави анісу звичайного, отримана за довжини хвилі детектування 255 нм

Таблиця

Ідентифікація речовин у спиртовому екстракті трави анісу звичайного, піки яких позначено на рис. 1

Номер піка на рис. 1	T, хв	I _L	I _T	Стандарт з найбільшою подібністю	Ідентифікація
1	3,767	0,863	-4,317	катехін	катехіноподібна сполука
2	4,193	-4,619	-11,610	геністин	н/і
3	6,932	0,817	-2,968	кавова кислота	гідроксикорична кислота
4	10,444	0,935	0,567	хлорогенова кислота	гідроксикорична кислота
5	10,990	0,950	0,887	хлорогенова кислота	хлорогенова кислота
6	11,394	0,867	-1,31	катехін	катехін
7	13,757	0,667	-1,857	кавова кислота	гідроксикорична кислота
8	14,221	0,900	-2,344	хлорогенова кислота	гідроксикорична кислота
9	15,479	0,736	-2,880	мірицетин	глікозид мірицетину
10	15,845	0,856	-5,94	лютеолін	глікозид лютеоліну
11	16,263	0,903	-5,522	лютеолін	глікозид лютеоліну
12	17,236	0,910	-6,519	апигенін	глікозид апигеніну
13	17,759	0,917	-5,996	апигенін	глікозид апигеніну
14	17,859	0,866	-3,926	лютеолін	глікозид лютеоліну
15	18,127	0,408	0,973	кверцетин	рутин
16	18,513	0,658	0,154	мірицетин	глікозид мірицетину
17	19,647	0,892	-2,138	лютеолін	глікозид лютеоліну
18	20,382	0,643	-0,0226	мірицетин	глікозид флавонолу
19	21,579	0,755	0,968	кверцетин	кверцетин
20	30,081	-1,825	-12,278	геністин	н/і
21	37,568	0,495	-19,178	нарингін	н/і

поліфенолів і фенольних кислот – він становив 17,576 мг/г.

Логічним продовженням роботи було визначення рівня антиоксидантної активності (АОА) поліфенольних сполук трави анісу звичайного. Для цього застосовували потенціометричний метод з використанням розчину суміші сполук $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ як медіаторної системи. Кількісну оцінку АОА визначали щодо аскорбіно-

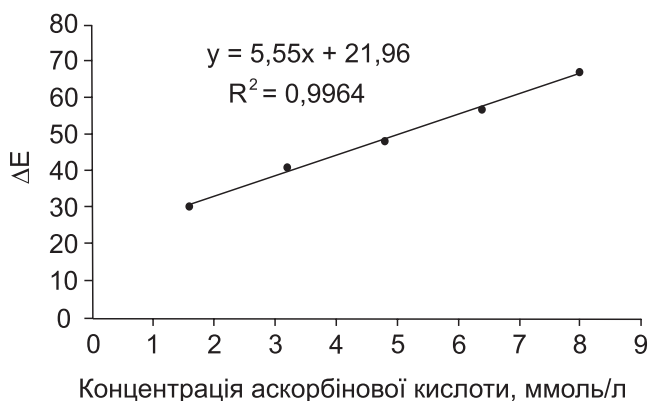


Рис. 2. Градувальна пряма зміни потенціалу стандартних розчинів аскорбінової кислоти

вої кислоти, для якої вимірювали зміни потенціалу за додавання до медіаторної системи в інтервалі концентрацій 1,6–8,0 ммоль/л (рис. 2).

Значення АОА екстракту трави анісу звичайного (ммоль/г) визначали за формулою:

$$AOA = \frac{V_1 \cdot C_x \cdot V_3 \cdot 100}{m_H \cdot V_2 \cdot (100 - W)},$$

де: V_1 – об'єм розчину А, л; V_2 – об'єм розчину Б, л; V_3 – об'єм розчину В, л; C_x – значення АОА за градуальною прямою, ммоль/л; m_H – маса наважки сировини, г; W – втрата в масі під час висушування, %.

Також за цим методом було обчислено значення АОА для рутину (ммоль/г) за формулою:

$$AOA = \frac{V \cdot C_x \cdot 100}{m_H \cdot (100 - W)},$$

де: V – об'єм розчину, л; C_x – значення АОА за градуальною прямою, ммоль/л; m_H – маса наважки рутину, г; W – втрата в масі під час висушування, %;

У результаті проведених експериментів було визначено, що поліфенольні сполуки трави анісу зви-

чайного виявляють АОА на рівні $67,76 \pm 0,05$ ммоль/г. Водночас рутин виявив значно вищий рівень АОА, який становив $3979,59 \pm 0,08$ ммоль/г.

Експериментальна частина

Траву анісу звичайного було заготовлено в період цвітіння влітку 2019 року в Харківській області, Україна (достовірність сировини визначено куратором гербарію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, кандидатом біол. наук, доцентом Ю. Г. Гамулею, номер гербарного зразка CWU0057573).

Методика визначення поліфенольних сполук трави анісу звичайного методом високоефективної рідинної хроматографії

Для екстракції поліфенолів до наважки зразка додавали 70% (об/об) етанол у співвідношенні 1 г зразка на 20 мл розчину етанолу [23]. Екстракцію проводили в герметичній ємності без доступу світла для запобігання трансформації екстрагованих речовин протягом 5 діб за кімнатної температури і періодичного перемішування. Витяжки перед аналізом фільтрували з використанням шприцевого фільтра Supelco Iso-Disc Filters PTFE 25-4 (25 мм × 0,45 мкм).

Аналіз екстракту проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за допомогою рідинної хроматографічної системи Prominence LC-20 Shimadzu (Японія), що складалася з таких функціональних модулів: дегазатор DGU-20A3, насосний модуль LC-20AD, автосемплер-холодильник SIL-20AC, фотометричний детектор SPD-20AV, термостат CTO-20A, колонка Agilent Technologies Microsorb-MV-150 (обернено-фазова, C18 модифікований силікагель, довжина 150 мм, діаметр 4,6 мм, розмір зерен сорбенту 5 мкм).

Умови ВЕРХ:

1) склад рухомої фази: компонент А – метанол, компонент В – 0,9% розчин фосфатної кислоти в деіонізованій воді;

2) режим хроматографування – градієнтний, розроблений для якісного розділення окремих фенольних кислот і флавоноїдів у рослинних екстрактах [24, 25]. Схема градієнта за вмістом компонента А в рухомій фазі була така:

- початковий вміст – 10%;
- перші 13 хвилин – підвищення вмісту з 10 до 40%;
- з 13-ої до 20-тої хвилини – підвищення вмісту від 40 до 53%;
- з 20-ої до 26-ої хвилини – підвищення вмісту від 53 до 55%;

- з 26-ої до 40-ої хвилини – утримування вмісту 55%;
 - з 40-ої до 41-ої хвилини – зниження вмісту до 10%;
 - з 41-ої до 56-ої хвилини – утримування вмісту 10%;
- 3) швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв;
4) температура колонки – 40°C;
5) об'єм інжекції – 5 мкл.

Ідентифікаційні характеристики стандартів отримували за умов хроматографування, що аналогічні тим, які було використано під час дослідження екстракту. Калібрувальні залежності «площа піка – вміст стандарту» були лінійними з коефіцієнтами кореляції не нижче $r = 0,996$.

Визначення АОА поліфенольних сполук трави анісу звичайного

Для визначення АОА застосовували потенціометричний метод із використанням $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ як медіаторної системи з концентрацією компонентів 0,002/0,00002 моль/л та рН на рівні 7,2 (фосфатний буфер). З отриманого 70%-ного етанольного екстракту трави анісу звичайного (розчин А) відбирали аліквоту 10,0 мл (розчин Б) і поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм розчину 70% етанолом до мітки і перемішували (розчин В).

Для приготування розчину рутину 0,05 г (точна наважка) рутину (ФС-42-2508-87) вносили в мірну колбу ємністю 100 мл, розчиняли в 70% етанолі, доводили об'єм розчину до мітки і перемішували.

Вимірювали початковий потенціал вихідного розчину медіаторної системи, далі в електрохімічну комірку вносили 1 мл екстракту та вимірювали кінцевий потенціал, після цього визначали різницю між початковим та кінцевим потенціалами (рН-метр – Hanna 2550, з редокс-електродом EZDO P050).

Паралельно в тих же умовах вимірювали антиоксидантну активність розчину рутину.

Висновки

Методом високоефективної рідинної хроматографії визначено якісний склад та кількісний вміст поліфенольних сполук в етанольному екстракті трави анісу звичайного. Сумарний вміст поліфенольних сполук склав 17,576 мг/г. Виявлено, що антиоксидантна активність етанольного екстракту трави анісу звичайного щодо активності аскорбінової кислоти становить $67,76 \pm 0,05$ ммоль/г.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

1. Pimenov, M. G.; Leonov, M. V. *The Genera of the Umbelliferae: A nomenclator*; Royal Botanic Gardens, Kew: London, 1993.
2. Orav, A.; Raal, A.; Arak, E. Essential oil composition of Pimpinella anisum L. fruits from various European countries. *Natural Product Research* **2008**, *22* (3), 227–232. <https://doi.org/10.1080/14786410701424667>.
3. Iannarelli, R.; Caprioli, G.; Sut, S.; Dall'Acqua, S.; Fiorini, D.; Vittori, S.; Maggi, F. Valorizing overlooked local crops in the era of globalization: the case of aniseed (Pimpinella anisum L.) from Castignano (central Italy). *Industrial Crops and Products* **2017**, *104*, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.028>.
4. Fujimatu, E.; Ishikawa, T.; Kitajima, J. Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise. *Phytochemistry* **2003**, *63* (5), 609–616. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00179-1).
5. Bettaieb Rebey, I.; Bourgou, S.; Aidi Wannes, W.; Hamrouni Selami, I.; Saidani Tounsi, M.; Marzouk, B.; Fauconnier, M. L.; Ksouri, R. Comparative assessment of phytochemical profiles and antioxidant properties of Tunisian and Egyptian anise (Pimpinella anisum L.) seeds. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **2018**, *152* (5), 971–978. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1403394>.
6. Kartnig, T.; Moeckel, H.; Maunz, B. ÜBER DAS VORKOMMEN VON CUMARINEN UND STEROLEN IN GEWEBEKULTUREN AUS WURZELN VON ANETHUM GRAVEOLENS UND PIMPINELLA ANISUM. *Planta Med* **1975**, *27* (1), 1–4. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097751>.
7. Al-Saadi, S. A. A.; Al-Derawi, K. H.; Abd Al-azem, D. Variation in Essential Oil Content and Composition (Pimpinella anisum L.). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **2016**, *6* (2), 43–57.
8. Leung, A. Y.; Foster, S. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, 2nd Ed.; John Wiley & Sons: New York, NY, 1996.
9. Bown, D. *DuMont's grosse Kräuter-Enzyklopädie*; Du Mont Buchverlag: Köln, 1998.
10. Radaelli, M.; da Silva, B. P.; Weidlich, L.; Hoehne, L.; Flach, A.; da Costa, L. A. M. A.; Ethur, E. M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against Clostridium perfringens. *Brazilian Journal of Microbiology* **2016**, *47* (2), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.10.001>.
11. Conforti, F.; Tundis, R.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G. A.; De Cindio, B.; Menichini, F.; Houghton, P. J. Protective Effect of Pimpinella anisoides Ethanolic Extract and Its Constituents on Oxidative Damage and Its Inhibition of Nitric Oxide in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Medicinal Food* **2010**, *13* (1), 137–141. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0154>.
12. Pontes, V. C. B.; Rodrigues, D. P.; Caetano, A.; Gamberini, M. T. Preclinical investigation of the cardiovascular actions induced by aqueous extract of Pimpinella anisum L. seeds in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *237*, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.050>.
13. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bio-availability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18* (14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.
14. Khan, H. Y.; Hadi, S. M.; Mohammad, R. M.; Azmi, A. S. Prooxidant anticancer activity of plant-derived polyphenolic compounds: An underappreciated phenomenon. In *Functional Foods in Cancer Prevention and Therapy*; Kabir, Y., Ed.; Academic Press: 2020; Chapter 12, pp 221–236.
15. Piao, M. J.; Kang, K. A.; Zhen, A. X.; Fernando, P. D. S. M.; Ahn, M. J.; Koh, Y. S.; Kang, H. K.; Yi, J. M.; Choi, Y. H.; Hyun, J. W. Particulate Matter 2.5 Mediates Cutaneous Cellular Injury by Inducing Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Stress: Protective Effects of Ginsenoside Rb1. *Antioxidants* **2019**, *8* (9), 383.
16. Das, L.; Vinayak, M. Long Term Effect of Curcumin in Restoration of Tumour Suppressor p53 and Phase-II Antioxidant Enzymes via Activation of Nrf2 Signalling and Modulation of Inflammation in Prevention of Cancer. *PLOS ONE* **2015**, *10* (4), e0124000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124000>.
17. Zhang, J. F.; Liu, J.; Wu, J. L.; Li, W. F.; Chen, Z. W.; Yang, L. S. Progression of the role of CRYAB in signaling pathways and cancers. *Onco Targets Ther.* **2019**, *12*, 4129–4139. <https://doi.org/10.2147/OTTS201799>.
18. Ho, H.-C.; Huang, C.-C.; Lu, Y.-T.; Yeh, C.-M.; Ho, Y.-T.; Yang, S.-F.; Hsin, C.-H.; Lin, C.-W. Epigallocatechin-3-gallate inhibits migration of human nasopharyngeal carcinoma cells by repressing MMP-2 expression. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (11), 20915–20924. <https://doi.org/10.1002/jcp.28696>.
19. Khodakov, I. V. The HPLC Method Of Identification Of Polyphenols In Plant Extracts By Example Of Determination Of Isoflavone Composition In Soy Seeds. *Methods and objects of chemical analysis* **2013**, *8* (3), 132–142.
20. Semenistaya, E. N.; Larionov, O. G. Characterization of the composition and antioxidant activity of plant extracts by HPLC with UV and amperometric detection. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **2008**, *42* (9), 43–48.
21. Wang, L.-H.; Li, W.-H. General method for determining of flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **2007**, *41* (4), 46–51.
22. Moiseev, D. V.; Buzuk, G. N.; Sheluto, V. L. HPLC identification of flavonoids in plants. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **2011**, *45* (1), 35–38.
23. Levitsky, A. P.; Khodakov, I. V.; Raitseva, E. S. Extraction of polyphenols from grape leaves. *Food science and technology* **2012**, *6* (3), 36–37.
24. Вертикова, Е. К.; Ходаков, И. В.; Левицкий, А. П. Метод определения хлорогеновой кислоты. *Вісник стоматології* **2010**, *73* (5), 2–5.
25. Ходаков, И. В.; Макаренко, О. А.; Левицкий, А. П.; Сичкарь, В. И. Сортовые особенности сои украинской селекции по содержанию полифенолов в листьях. *Физиология растений и генетика* **2014**, *46* (1), 27–36.

Received: 15. 09. 2020

Revised: 23. 12. 2020

Accepted: 27. 01. 2021

Стаття є фрагментом комплексних наукових робіт Національного фармацевтичного університету за темою «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (№ держреєстрації 0114U000946).

Д. М. Зозулинець, А. Г. Каплаушенко, А. С. Коржова

Запорізький державний медичний університет, Україна

69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. E-mail: zozulnetsd@gmail.com

Синтез та взаємодія з альдегідами 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу

Мета. Синтезувати 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіол та дослідити його реакційну здатність у взаємодії з альдегідами.

Результати та їх обговорення. Синтезовано 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіол та на його основі одержано ряд 4-(етил, арил)іденамінопохідних.

Експериментальна частина. За допомогою серії з чотирьох послідовних реакцій на основі хінолін-2-карбонової кислоти синтезовано 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіол, взаємодія якого з альдегідами дозволила одержати ряд 4-(етил, арил)іденамінопохідних. Структуру всіх синтезованих сполук підтверджено за допомогою ІЧ- та ¹H ЯМР-спектроскопії, а також даними елементного аналізу, а їх індивідуальність – за допомогою тонкошарової хроматографії.

Висновки. Синтезовано 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіол та виявлено, що його взаємодія з альдегідами призводить до утворення нових 4-((етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолів.

Ключові слова: 5-(хінолін-2-іл)-1,2,4-триазол-3-тіол; 4-ариліденамінопохідні; кислота хінальдинова; біологічна активність

D. M. Zozulynets, A. G. Kaplaushenko, A. S. Korzhova

Zaporizhzhya State Medical University, Ukraine

The synthesis of 4-amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol and its interaction with aldehydes

Aim. To synthesize 4-amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol and study its reactivity in the reaction with aldehydes.

Results and discussion. 4-Amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol was synthesized, and a number of 4-(ethyl, aryl)idenamino derivatives were obtained on its basis.

Experimental part. Using a series of four successive reactions based on quinoline-2-carboxylic acid, 4-amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol was synthesized; its interaction with aldehydes allowed to obtain a number of 4-(ethyl, aryl)idenamino derivatives. The structure of all compounds synthesized was confirmed by IR and ¹H NMR spectroscopy, as well as by elemental analysis, and their purity by thin layer chromatography.

Conclusions. 4-Amino-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol has been synthesized. It has been found that its interaction with aldehydes leads to the formation of new 4-((ethyl, aryl)idenamino)-5-(quinolin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiols.

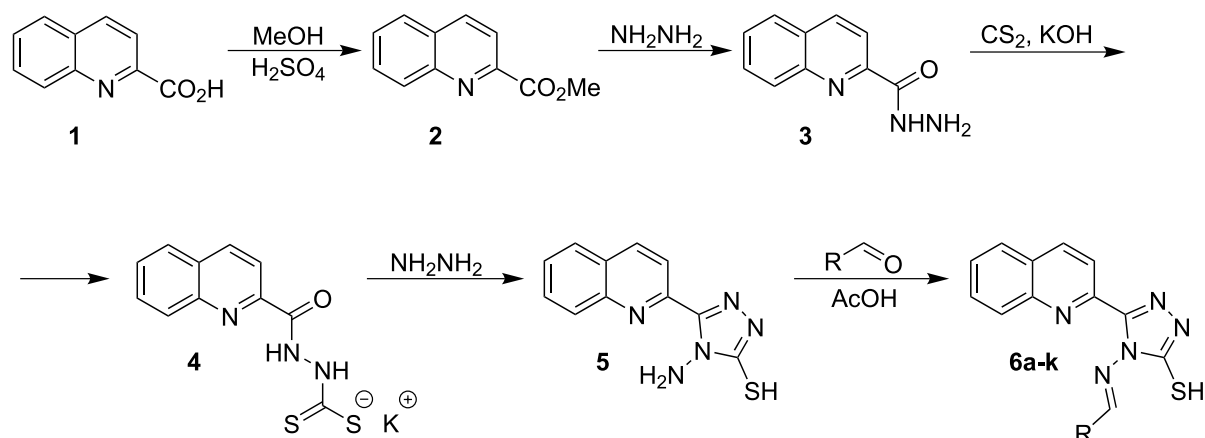
Key words: 5-(quinolin-2-yl)-1,2,4-triazole-3-thiol; 4-arylidenamino derivatives; quinaldic acid; biological activity

Copyright © 2021, D. M. Zozulynets, A. G. Kaplaushenko, A. S. Korzhova

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Аналіз сучасної літератури засвідчує актуальність пошуку біологічно активних речовин серед сполук, які містять ядро 1,2,4-триазолу. Зокрема, роботи наукової школи Запорізького державного медичного університету доводять, що 1,2,4-триазол є перспективним класом сполук для створення оригінальних лікарських препаратів, при цьому деякі похідні з цієї групи вже активно застосовують у ветеринарній та гуманній медицині [1–4]. Зокрема, фрагмент 1,2,4-триазолу широко використовують у медичній хімії для побудови молекул, що виявляють протигрибкову, антидепресивну, гепатопротекторну, ранозагоювальну та противірусну дію. Водночас дані науково-технічної літератури останніх років звертають увагу на те, що ядро хіноліну також є структурним фрагментом біологічно активних сполук з вираженою протимікробною та антисептичною дією [5–7].

Наразі широко досліджено біологічну активність 1,2,4-триазолів, що містять різноманітні замісники при N1(N2)-атомі [8]. Особливу увагу привертають роботи вітчизняних авторів, де наведено результати фармакологічної активності S-похідних – 5-R-1,2,4-триазол-3-тіонів [9–11]. Але недостатньо вивчено фармакологічну активність похідних у ряді 4,5-дизаміщених 1,2,4-триазол-3-тіонів. Саме тому синтез, вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей 4,5-дизаміщених 1,2,4-триазол-3-тіонів, на нашу думку, мають наукову новизну, теоретичну та практичну значущість. Зокрема, у цьому дослідженні наведено синтез 1,2,4-триазолу, заміщеного за положеннями 4 та 5, причому одним із замісників є хіноліновий фрагмент. Можна припустити, що поєднання фармакофорних фрагментів 1,2,4-триазолу та хіноліну в одній молекулі буде адитивно впливати на прояв наведених вище видів біологічної активності.



6a: R = Me; **6b:** R = Ph; **6c:** R = 3-F-Ph; **6d:** R = 4-F-Ph; **6e:** R = 2-HO-Ph; **6f:** R = 4-HO-Ph;
6g: R = 3-O₂N-Ph; **6h:** R = 2-HO₂C-Ph; **6i:** R = 4-HO₂C-Ph; **6j:** R = 4-Me₂N-Ph; **6k:** R = 2-MeO-4-HO-Ph

Схема. Синтез 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу (5) та його 4-(етил, арил)іденових похідних 6

Синтетичний шлях до 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу (5), недоступний в інформаційному полі наукової та патентної літератури, ми визначили як такий, що складається з 4 стадій (схема). Вихідною речовиною для його синтезу є хінальдинова кислота (1), яку в класичних умовах реакції естерифікації було перетворено на її метиловий естер 2. Дією на останній гідрозин гідрату одержали відповідний гідрозид хінальдинової кислоти (3), який вступає в реакцію з карбон дисульфідом у лужному середовищі з утворенням дитіокарбамінату 4. Замикання 1,2,4-триазолового циклу сполуки 5 відбувається за додавання до похідної 4 гідрозину гідрату.

Синтезований 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіол (5) – кристалічна речовина жовтого кольору, мало розчинна у воді, метанолі, розчинна в розчинах лугів та оцтовій кислоті за нагрівання.

У подальшому 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіол (5) використано як вихідну сполуку для синтезу ряду 4-((етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолів 6a–k шляхом його взаємодії з аліфатичними та ароматичними альдегідами. Реакцію проводили за кип'ятіння в середовищі оцтової кислоти. Синтезовані таким чином 4-(етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіоли (6a–k) є аморфними речовинами жовтого (6a–c, g–i), зеленого (6d), червоного (6k) та фіолетового (6j) кольору, мало розчинні у воді, розчинні в метанолі. Для аналізу сполуки 6a–k було очищено перекристалізацією із суміші оцтова кислота/вода (4:1).

Температури плавлення, виходи, дані елементного аналізу та спектральні характеристики синтезованих сполук 5 та 6 наведено в табл. 1–4.

В ІЧ-спектрах 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу (5) та 4-((етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолів 6 спосте-

рігаються характеристичні смуги валентних коливань, зокрема =C–H зв'язків у межах 3050–3025 см⁻¹, екзоциклічних C=N фрагментів сполук 6 у межах 1699–1680 см⁻¹, ендоциклічних C=N та C=C зв'язків за 1655–1485 см⁻¹, C–S-зв'язків за 757–624 см⁻¹.

У ¹H ЯМР-спектрі 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу (5) спостерігається синглет протонів аміногрупи за 5,79 м.ч., а також синглет протону SH-групи в дуже слабкому полі за 13,86 м.ч., який також присутній у спектрах усіх сполук 6. Характерним для ¹H ЯМР-спектрів 4-((етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолів (6a–k) є синглет протону –CH=N– фрагменту, який спостерігається за 6,58 м.ч. для етиліден похідної 6a та в діапазоні 9,08–9,87 м.ч. для ариліден похідних 6b–k.

Експериментальна частина

Вихідні сполуки з відповідними сертифікатами якості було одержано з комерційних джерел.

Таблиця 1

Виходи, температури плавлення сполук 5, 6a–k

Сполука	R	Т. пл., °C	Вихід, %
5	–	126–127	89
6a	Me	205–206	83
6b	Ph	206–208	79
6c	3-F-Ph	203–205	80
6d	4-F-Ph	205–207	85
6e	2-HO-Ph	242–245	89
6f	4-HO-Ph	246–249	80
6g	3-O ₂ N-Ph	115–117	83
6h	2-HOOC-Ph	191–193	79
6i	4-HOOC-Ph	145–147	80
6j	4-Me ₂ N-Ph	247–249	84
6k	2-MeO-4-HO-Ph	248–250	81

Таблиця 2

Результати елементного аналізу сполук **5, 6a–k**

Сполука	Брутто-формула	Розраховано, %				Визначено, %			
		C	H	N	S	C	H	N	S
5	C ₁₁ H ₉ N ₅ S	55,54	5,03	26,99	12,35	55,58	5,05	27,01	12,36
6a	C ₁₃ H ₁₁ N ₅ S	57,96	4,10	25,98	11,80	57,98	4,12	26,00	11,90
6b	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ S	65,66	4,92	20,14	9,21	65,68	4,93	20,16	9,23
6c	C ₁₉ H ₁₆ FN ₅ S	62,44	4,39	19,15	8,76	62,45	4,41	19,17	8,77
6d	C ₁₉ H ₁₆ FN ₅ S	62,43	4,40	19,16	8,75	62,45	4,41	19,17	8,77
6e	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ OS	62,22	3,75	20,15	9,21	62,23	3,77	20,16	9,23
6f	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ OS	62,77	4,69	19,26	8,80	62,79	4,71	19,27	8,82
6g	C ₁₉ H ₁₆ N ₆ O ₂ S	58,14	4,09	21,41	8,15	58,15	4,11	21,42	8,17
6h	C ₁₉ H ₁₃ N ₅ O ₂ S	60,77	3,48	18,65	8,52	60,79	3,49	18,66	8,54
6i	C ₁₉ H ₁₃ N ₅ O ₂ S	61,70	5,17	17,17	7,86	61,93	5,19	17,19	7,87
6j	C ₂₀ H ₁₈ N ₆ S	64,13	4,84	22,42	8,54	64,15	4,85	22,44	8,56
6k	C ₂₀ H ₁₉ N ₅ O ₂ S	61,04	4,86	17,60	8,15	61,05	4,87	17,80	8,12

Визначення температури плавлення проводили капілярним способом на приладі ПТП (М). Тонкошарову хроматографію нових похідних 1,2,4-триазолу проводили на пластинках силікагель 60 ALUGRAMSill G\UV254 (алюм.підкл. 20 × 20) (Махерей-Нагель), або силікагель 60 ALUGRAMSill G\UV254 (алюм.підкл. 10 × 20) (Махерей-Нагель), як рухову фазу використано суміш бутанол/оцтова кислота/вода у співвідношенні 10:3:9. Елементний склад синтезованих сполук визначали на елементному аналізаторі Elementar Vario Vario EL Cube (Elementar Vario, Німеччина), стандарт – сульфамід. ІЧ-спектри синтезованих речовин фіксували в таблетках калій броміду на спектрофотометрі Specord M-80 в ділянці спектра 4000–500 см⁻¹. Таблетки готували пресуванням після спільного

розтирання 200 мг калій броміду і 2 мг досліджуваної сполуки. ¹H ЯМР-спектри знімали на спектрометрі «Varian VXR-300» (робоча частота – 300 МГц), розчинник – DMSO-d₆, внутрішній стандарт – тетраметилсилан. Спектри інтерпретували з використанням комп'ютерної програми ADVASP 143.

Синтез 4-Аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу (5). Синтез сполуки **5** відбувався у 4 стадії, як вихідну речовину використовували хінальдинову кислоту. Проміжні сполуки **2–4** використовували в наступних стадіях без додаткового очищення.

Суміш 20,0 г (0,115 моль) хінальдинової кислоти (**1**), 100 мл метанолу і 2 мл концентрованої сульфатної кислоти кип'ятять протягом 12 год, розчинник випаровують, залишок промивають

Таблиця 3

Максимуми поглинання в ІЧ-спектрах 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолу (**5**) та 4-((етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-тіолів (**6a–k**)

Сполука	V _C =C та/або C=N ендоециклічні	V _C -H	V _C -S	V _{NH₂}	V _C =N екзоциклічні
5	1615	3040	624	3336/3205	–
6a	1605	3035	682	–	1680
6b	1650/1510	3050	682	–	1680
6c	1600/1506	3025	658	–	1681
6d	1605/1509	3030	695	–	1687
6e	1620/1495	3035	675	–	1688
6f	1610/1518	3020	665	–	1690
6g	1531/1485	3025	695	–	1699
6h	1655/1515	3025	681	–	1691
6i	1607/1504	3035	757	–	1681
6j	1595/1505	3030	655	–	1695
6k	1612/1500	3045	710	–	1682

Таблиця 4

¹H ЯМР спектри 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолу (**5**) та 4-((етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів **6a–k**

Сполука	Хімічний зсув (δ, м.ч.)
5	5,79 (2H, s, NH ₂); 7,58 (1H, t, <i>J</i> = 7,53 Гц, ArH); 7,70 (1H, d, <i>J</i> = 7,63 Гц, ArH); 7,83–7,98 (3H, m, ArH); 8,70 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 13,86 (1H, s, SH)
6a	0,83 (3H, d, <i>J</i> = 0,87 Гц, CH ₃); 6,58 (1H, q, <i>J</i> = 6,53 Гц, CH ₃ CH); 7,51–7,68 (2H, m, ArH); 7,80 (1H, t, <i>J</i> = 7,83 Гц, ArH); 7,93–8,02 (2H, m, ArH); 8,61 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 13,49 (1H, s, SH)
6b	7,50–7,66 (5H, m, ArH); 7,74–7,85 (3H, m, ArH); 7,94–8,02 (2H, m, ArH); 8,61 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,12 (1H, s, CH); 13,45 (1H, s, SH)
6c	7,42–7,65 (5H, m, ArH); 7,81–7,84 (2H, m, ArH); 7,93–8,03 (2H, m, ArH), 8,61 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,12 (1H, s, CH); 13,51 (1H, s, SH)
6d	7,29 (2H, t, <i>J</i> = 7,32 Гц, ArH); 7,56 (1H, t, <i>J</i> = 7,53 Гц, ArH); 7,65 (1H, d, <i>J</i> = 7,63 Гц, ArH); 7,87 (5H, m, ArH); 8,68 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,11 (1H, s, CH); 13,49 (1H, s, SH)
6e	6,91 (1H, d, <i>J</i> = 6,93 Гц, ArH); 7,14 (1H, t, <i>J</i> = 7,16 Гц, ArH); 7,29 (1H, t, <i>J</i> = 7,32 Гц, ArH); 7,51–7,66 (4H, m, ArH); 7,79 (1H, t, <i>J</i> = 7,83, ArH); 7,98 (1H, m, ArH); 8,67 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,14 (1H, s, CH); 11,09 (1H, s, OH); 13,61 (1H, s, SH)
6f	6,82 (2H, d, <i>J</i> = 6,85 Гц, ArH); 7,49–7,69 (4H, m, ArH); 7,79 (1H, t, <i>J</i> = 7,83 Гц, ArH); 7,98–8,04 (2H, m, ArH); 8,71 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,18 (1H, s, CH); 9,54 (1H, s, OH); 13,43 (1H, s, SH)
6g	7,50–7,86 (4H, m, ArH); 7,94–8,17 (4H, m, ArH); 8,43 (1H, s, ArH); 8,58 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,08 (1H, s, CH); 13,49 (1H, s, SH)
6h	7,49–8,05 (8H, m, ArH); 8,32 (1H, m, ArH); 8,69 (1H, m, ArH); 9,10 (1H, s, CH); 12,73 (1H, s, COOH); 13,83 (1H, s, SH)
6i	7,52–7,65 (2H, m, ArH); 7,83 (1H, t, <i>J</i> = 7,83 Гц, ArH); 7,96 (4H, m, ArH); 8,28 (2H, d, <i>J</i> = 8,35 Гц, ArH); 8,63 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,18 (1H, s, CH); 12,65 (1H, s, OH); 13,80 (1H, s, SH)
6j	3,13 (3H, s, CH ₃); 3,15 (3H, s, CH ₃); 6,82 (2H, d, <i>J</i> = 6,82 Гц, ArH); 7,48 (3H, m, ArH); 7,59 (1H, d, <i>J</i> = 7,63 Гц, ArH); 7,79 (1H, t, <i>J</i> = 7,83 Гц, ArH); 7,94–8,03 (2H, m, ArH); 8,59 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,87 (1H, s, CH); 13,47 (1H, s, SH)
6k	3,79 (3H, s, OCH ₃); 6,45 (2H, m, ArH); 7,51–7,75 (3H, m, ArH); 7,85 (1H, t, <i>J</i> = 7,83 Гц, ArH); 7,93–8,01 (2H, m, ArH); 8,62 (1H, d, <i>J</i> = 8,65 Гц, ArH); 9,08 (1H, s, CH); 9,93 (1H, s, OH); 13,38 (1H, s, SH)

розчином натрій гідрокарбонату до нейтрально-го середовища та відфільтровують утворений метиловий естер хінолін-2-карбонової кислоти (**2**). Вихід – 87,5%.

До розчину 17,5 г (0,116 моль) метилового естеру хінолін-2-карбонової кислоти (**2**) в 100 мл етилового спирту додають 12,8 мл 40% розчину гідрозин гідрату, розчин кип'ятять протягом 4 годин, охолоджують та відфільтровують утворений осад хінолін-2-карбогідрозиду (**3**). Вихід – 84%.

До 18,72 г (0,1 моль) хінолін-2-карбогідрозиду (**3**) додають розчин 8,98 г (0,16 моль) калій гідроксиду у 200 мл 1-бутанолу. Отриману суміш охолоджують до 10°C та перемішують протягом 1 години. До утвореного розчину, який міститься в тригорлій колбі, протягом 40 хв додають 11,42 мл (0,15 моль) карбон дисульфід та 150 мл 1-бутанолу в один і той же час, суміш перемішують 14 годин за температури 20°C, утворений осад калій хінолін-2-карбамінодитіокарбамінату (**4**) фільтрують та промивають діетиловим етером. Вихід – 79,6%.

У тригорлу колбу на 250 мл завантажують 30,2 г (0,1 моль) калій хінолін-2-карбамінодитіокарбамінату (**4**), 14,7 г (0,4 моль) гідрозин гідрату (у перерахунку на 40% розчин). Суміш кип'ятять 2 год, охолоджують, додають 5 мл холодної води. Нейтралізують концентрованою хлоридною кис-

лотою, утворений осад 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолу (**5**) відфільтровують. Кристалічна речовина жовтого кольору. Вихід – 89%. Фізико-хімічні та спектральні характеристики сполуки **5** наведено в табл. 1–4.

Синтез 4-((Етил, арил)іденаміно)-5-(хінолін-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів 6a–k. До розчину 0,01 моль 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолу (**5**) в 40 мл оцтової кислоти додають 0,01 моль відповідного альдегіду, суміш нагрівають до утворення розчину і залишають за кімнатної температури на 48 год. Осади цільових продуктів реакції відфільтровують, промивають діетиловим етером, висушують на повітрі та кристалізують із суміші оцтова кислота/вода (4:1). Фізико-хімічні та спектральні характеристики сполук **6** наведено у табл. 1–4.

Висновки

Розроблено ефективний спосіб одержання 4-аміно-5-(хінолін-2-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолу на основі хінальдинової кислоти за допомогою реакцій естерифікації, гідрозинолізу, приєднання, циклізації. Взаємодією одержаної похідної 1,2,4-триазолу з альдегідами синтезовано ряд нових 4-((етил, арил)іденаміно)похідних.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

1. Kaplaushenko, A. G. Acylation of 4-mono- and 4,5-disubstituted 1,2,4-triazol-3-thiones and data of acute toxicity of reaction products. *Ukrainian biopharmaceutical journal* **2014**, 2, 50–54.
2. Rud, A. M.; Kaplaushenko, A. G.; Sameliuk, Y. G. Synthesis of new alkylsulfonyl(sulfinyl)-1,2,4-triazole derivatives based on (3-(alkylthio)-4-R-1,2,4-triazole-5-yl)(phenyl)methanol's. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice* **2018**, 11 (1), 23–28. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2018.1.123641>.
3. Kaplaushenko, T. M.; Panasenko, O. I.; Sameliuk, Y. G. Synthesis and establishment of physico-chemical constants of 2-(5-(chinoline-2-yl, 2-hydroxyquinoline-4-yl)-4-R-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetic acids and their esters. *Farmatsevtichnyi zhurnal* **2016**, 2, 53–59. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.16.04>.
4. Kaplaushenko, T. M. Synthesis, physical-chemical properties and further transformation of 5-(quinoline-2-yl, 2-hydroxyquinoline-4-yl)-4-R-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice* **2016**, 2, 20–25. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2016.2.71083>.
5. Каплаушенко, А. Г.; Книш, Є. Г.; Панасенко, О. І.; Самелюк, Ю. Г.; Кучерявий, Ю. М.; Щербак, М. О.; Каплаушенко, Т. М.; Рудь, А. М.; Гуліна, Ю. С. *Практичне значення та застосування похідних 1,2,4-триазолу*. Запорізький державний медичний університет: Запоріжжя, 2016.
6. Колесник, Ю. М.; Каплаушенко, А. Г.; Книш, Є. Г.; Панасенко, О. І.; Щербак, М. О.; Самелюк, Ю. Г. *Похідні 4-аміно та 3-тіо-1,2,4-триазолу як потенційні лікарські засоби*; ТОВ «Карат»: Запоріжжя, 2014.
7. Машковский, М. Д. *Лекарственные средства*, 15-е изд.; Новая волна: Москва, 2005.
8. Peyton, L.R.; Gallagher, S.; Hashemzadeh, M. Triazole antifungals: a review. *Drugs of Today* **2015**, 51 (12), 705–718. <https://doi.org/10.1358/dot.2015.51.12.2421058>.
9. Sattar, A.; Ur Rehman, A.; Abbasi, M. A.; Siddiqui, S. Z.; Rasool, Sh.; Khalid, H.; Lodhi, M. A.; Khan, F. A. Synthesis, biological evaluation, and in silico study of some unique multifunctional 1,2,4-triazole acetamides. *Turkish Journal of Chemistry* **2018**, 42 (2), 401–417. <https://doi.org/10.3906/kim-1706-50>.
10. Kaplaushenko, A. H.; Knysh, Ye. H.; Panasenko, O. I. Search of biologically active substances among 4-mono and 4,5-disubstituted 1,2,4-triazol-3-thions and their derivatives. *Pharmaceutical Review* **2007**, 1, 32–35.
11. Kaplaushenko, A. G. The use of 1,2,4-triazole derivatives as those, that are widely used in medicine, and the creation of potential medicines based on this heterocycle. *Scientific Journal of the Ministry of Health of Ukraine* **2013**, 3, 152–159.
12. Kaplaushenko, A. G. Synthesis methods and biological activity of 1,2,4-triazol-3-thions. *Ukrainian biopharmaceutical journal* **2009**, 4, 48–53.
13. Kaplaushenko, A. G. Chemical properties of amino- and thio-derivatives of 1,2,4-triazoles. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice* **2015**, 1, 101–106. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2015.1.41702>.
14. Казицына, Л. А.; Куплетская, Н. Б. *Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрологии в органической химии*. Издательство Московского университета: Москва, 1979.

Received: 18. 07. 2020

Revised: 23. 11. 2020

Accepted: 02. 12. 2020

O. Yu. Maslov, S. V. Kolisnyk, T. A. Kostina, Z. V. Shovkova,
E. Yu. Ahmedov, M. A. Komisarenko

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine
53, Pushkins'ka str., Kharkiv, 61002. E-mail: alexmaslov392@gmail.com

Validation of the alkalimetry method for the quantitative determination of free organic acids in raspberry leaves

Organic acids are a large group of biologically active compounds that perform important functions in the plant organism. Moreover, all plants, regardless of the species and family, contain organic acids to a small or large extent as organic acids belong to intermediate metabolites arising from the oxidation of proteins and amino acids, fats and carbohydrates.

Aim. To validate the method of alkalimetry proposed with potentiometric detection of the end-point for the quantitative determination of free organic acids in raspberry leaves.

Results and discussion. The method proposed was validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. The linearity was in the concentration range of 40–200% ($r^2 = 0.9991$). The percentage of recovery was found to be in the range of 98.77–102.48%. The repeatability and intermediate precision were 1.58% and 1.74%, respectively. The method is accurate and reliable, with the relative standard deviation of less than 2%.

Experimental part. Leaves of raspberry were collected in the Kharkiv region during the period of full ripening. A Hanna 2550 pH-meter with a HI 1131P potentiometric electrode was used for alkalimetric titration of free organic acids. The titration was carried out using a microburette with Class A accuracy.

Conclusions. The alkalimetry method for the quantitative determination of free organic acids in raspberry leaves has been proposed and validated according to the following parameters: specificity, linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision, robustness. It has been confirmed that the method is simple, reliable, accurate and cost-effective.

Key words: raspberry; leaves; free organic acids; alkalimetry; validation

**О. Ю. Маслов, С. В. Колісник, Т. А. Костіна, З. В. Шовкова, Е. Ю. Ахмедов,
М. А. Комісаренко**

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Україна

Валідація алкаліметричної методики кількісного визначення вільних органічних кислот у листі малини

Органічні кислоти – велика група біологічно активних сполук, які виконують важливі функції в обміні речовин рослин. Усі рослини, незалежно від виду та родини, містять органічні кислоти в невеликій або значній кількості, бо ці речовини належать до проміжних метаболітів, що утворюються в результаті окиснення білків, амінокислот, жирів та вуглеводів.

Мета. Валідувати запропоновану алкаліметричну методику з потенціометричним виявленням кінцевої точки титрування для кількісного визначення вільних органічних кислот у листі малини.

Результати та їх обговорення. Запропонований метод валідовано згідно з директивою International Conference on Harmonization. Лінійність зберігалася в діапазоні концентрацій 40–200% ($r^2 = 0,9991$). Визначено, що відсоток відновлення становить 98,77–102,48%, повторюваність та проміжна точність – 1,58% та 1,74% відповідно. Метод характеризується як точний і надійний, має відносне стандартне відхилення менше 2%.

Експериментальна частина. Листя малини в період повного дозрівання збирали в Харківській області. Для алкаліметричного титрування вільних органічних кислот використовували рН-метр Hanna 2550 з потенціометричним електродом HI 1131P. Титрування проводили мікробюреткою з класом точності А.

Висновки. Розроблену титриметричну методику кількісного визначення вільних органічних кислот у листі малини валідовано за такими параметрами: специфічність, лінійність, точність, збіжність, внутрішня прецизійність, робастність. Підтверджено, що метод є простим, надійним, точним та економічно вигідним.

Ключові слова: малина; листя; вільні органічні кислоти; алкаліметрія; валідація

Copyright © 2021, O. Yu. Maslov, S. V. Kolisnyk, T. A. Kostina, Z. V. Shovkova, E. Yu. Ahmedov
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

A variety of biologically active compounds have been found in raspberry leaves, including flavonoids, phenolic acids, organic acids, ellagitannins, gallotannins and proanthocyanidins [1, 2]. There is a rather high interest in determining the amount of organic acids in raspberry leaves in literary sources [3, 4]. According to these studies, the total amount of organic acids is relatively high and ranges from 1.1 to 2.3%; it makes raspberry leaves a promising raw material of organic acids [5, 6].

Organic acids are a group of biologically active compounds with a wide spectrum of the pharmaco-

logical activity. They reveal vitamin properties, possess the choleric effect, and normalize the activity of the digestive system. Organic acids regulate the secretion of the bile and pancreatic juice, improve appetite, possess bactericidal properties and reduce putrefactive processes in the body [7].

Nowadays there are various analytical methods for determining organic acids such as titration, ion chromatography [8], high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV) [9], capillary electrophoresis [10], gas chromatography (GC) [11] and thin-layer chromatography [12].

Although HPLC-UV and GC have been proposed for the determination of organic acids before, they require high skillful analysts and expensive instruments. In addition, most of the procedures previously described require expensive instrumental setup. That is why in the current work the method of alkalimetry with potentiometric detection of the end-point was chosen for determining organic acids in raspberry leaves as it is simple, reliable, rapid and economical. Thus, the aim of the study was to validate the method proposed for the quantitative determination of free organic acids in raspberry leaves.

Experimental part

The study object was raspberry leaves collected in the Kharkiv region during the period of full ripening, according to the rules of harvesting this type of plant. Drying of leaves was carried out at a temperature of 60 °C to a residual humidity of not more than 20%. A Hanna 2550 pH meter with HI 1131P potentiometric electrode was used in the study. All titrations were carried out manually. Free organic acids were titrated using a microburette with Class A accuracy. Weighing was carried out using an AN100 digital analytical balance (AXIS, Ukraine) with $d = 0.0001$ g.

Citric acid was purchased from Sigma Aldrich ($\geq 98\%$), NaOH was of analytical grade. In order to prepare NaOH solution with the concentration of 0.05 M, 1.0 g of NaOH was dissolved in distilled water. The solution was diluted to 250 mL with the same water and standardized.

The procedure of the quantitative determination of free organic acids in raspberry leaves. Place 2.0 g (accurate weight) of the crushed raw material in a 100 mL flask with a ground glass joint, then pour 40 mL of distilled water in the flask, equip it with a condenser and keep the flask for 2 h on a boiling

water bath. After cooling quantitatively transfer the solution into a 50 mL volumetric flask and dilute to the volume (solution A).

Place 5.00 mL of the solution A in a 100 mL flask, and add 45.0 mL of distilled water with the subsequent titration of the solution by 0.05 M sodium hydroxide. After adding each portion of 0.05 M sodium hydroxide mix the solution thoroughly, and record the electrode potential.

The blank experiment was also performed. According to it, the blank volume of 0.05 M sodium hydroxide was 0.03 mL.

The content of organic acids in the solution was calculated from the value of the equivalent volume of the titrant. The equivalent volume of the titrant was determined by a differential curve constructed in the $\Delta E/\Delta V - V$ coordinates. The equivalence point was fixed at the maximum of the differential curve. The perpendicular line was dropped to the horizontal axis (the volume of the titrant) through the maximum, and the volume of the titrant spent on titration was determined (Fig. 1).

The content of free organic acids (X, %) with reference to citric acid in the completely dry raw material was calculated by the following formula:

$$X = \frac{(V_{eq} - V_x) \cdot 0.0032 \cdot 50 \cdot 100 \cdot K}{m \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

where: 0.0032 – is the amount of citric acid equivalent to 1 mL of sodium hydroxide solution (0.05 mol/L), g; V_{eq} – is the volume of sodium hydroxide solution (0.05 mol/L) used for titration, mL; V_x – is volume of sodium hydroxide solution (0.05 mol/L) spent for titration in the blank experiment, mL; m – is the mass of the raw material used, g; K – is the correction coefficient for 0.05 mol/L sodium hydroxide solution; W – is the loss on drying of the raw material, %.

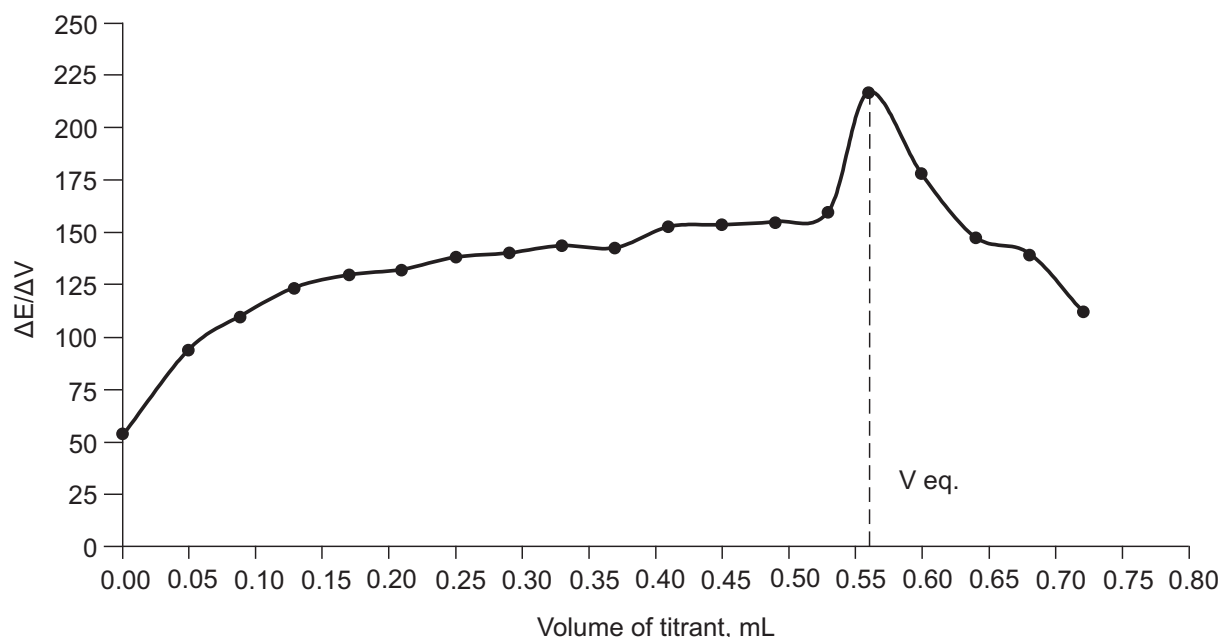


Fig. 1. The potentiometric titration curve of determination total free organic acids in raspberry leaves

Validation

Validation of the alkalimetric method for the quantitative determination of the amount of free organic acids in raspberry leaves by potentiometric titration was performed according to the International Conference on Harmonization (ICH). The titrimetric method proposed was validated by the following parameters: specificity, accuracy, linearity, repeatability, intermediate precision, robustness.

The specificity of the method was studied by potentiometric titration of the solvent.

The accuracy was verified by the method of additives in a triplicate analysis of three levels of concentration of organic acids corresponding to 40, 60, 80% of the working concentrations of organic acids. The standard solution of citric acid was prepared as follows: 0.076 g (accurate weight) of citric acid was placed in a 200.00 mL volumetric flask, and the solution was diluted to the volume with distilled water. Then an aliquot of the resulting standard solution of 2.00, 3.00, 4.00 mL was taken and placed in a 100.0 mL flask. After that 5.00 mL of the extract obtained from raspberry leaves was added to the flask, then 45.0 mL of distilled water was added, and the solution was titrated. The evaluation criterion in determining the accuracy was the value of the relative standard deviation (RSD), which according to the requirements should be not more than 2%, and the percentage of recovery should be from 95 to 105%.

The linearity of the method was studied at 9 concentration levels (40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200%) of the theoretical content of the total amount of free organic acids (calculated with reference to citric acid, %) in raspberry leaves. In order to evaluate linearity of the method, different aliquots of the extract were taken (2.00; 3.00; 4.00; 5.00; 6.00; 7.00; 8.00; 9.00; 10.00 mL). After that each aliquot was placed in a 100.0 mL flask and diluted to the volume with distilled water. The quantitative content of the total amount of free organic acids (calculated with reference to citric acid, %) in raspberry leaves in the solutions obtained was then determined according to the alkalimetry method of titration. The linearity was assessed by a linear relationship between the concentration of the total amount of free organic acids and the equivalent volume of the titrant, as well as the correlation coefficient calculated. The linear regression was calculated by the method of least squares to obtain the regression equation and determine the correlation coefficient (r^2). According to the requirements of ICH, the value of the correlation coefficient when studying the linearity of the analytical method for determining the quantitative content of the active substance should be ≥ 0.999 .

The repeatability of the method was checked by preparing an aqueous extract of raspberry leaves from 6 portions of the raw material within a short period of

time using the same set of reagents and with the participation of the same analyst. The intermediate precision was determined as described above in the same laboratory, but in different days. The acceptance criterion is expressed by the value of the relative standard deviation, which should not exceed 2%.

The robustness of the potentiometric procedure was tested at 100% concentration of free organic acids with the participation of two different analysts and two different burettes. The acceptance criterion is expressed by the value of the relative standard deviation, which should not exceed 2%.

The statistical processing of experimental data obtained was performed in accordance with the monograph «Statistical analysis of the results of a chemical experiment» of the State Pharmacopeia of Ukraine.

Results and discussion

When studying the specificity of the method, it was shown that the solvent used in the samples preparation and the probable impurities did not affect the result of the quantification of the amount of free organic acids in raspberry leaves (Table 1).

Linearity was proven in the concentration range from 40% to 200%. A calibration curve of the dependence of the equivalent volume of the titrant values on the volume of aliquots of the extract from raspberry leaves was plotted (Fig. 2). The regression equation of the curve had the following form: $y = 0.1667x - 0.2722$. The value of the correlation coefficient (r^2) was equal to 0.9991 (Fig. 2).

When testing the method for the quantitative determination of the amount of free organic acids by linearity parameters it was found that the correlation coefficient (r^2) was 0.9991. Therefore, there is a direct linear relation between the equivalent volume of the titrant and the concentration of organic acids.

Table 1

The results of the titration to prove the specificity of the method developed ($n = 3$, $P = 95\%$)

V_{titrant} , mL	Content of organic acids, %	Statistical analysis
Blank experiment (titration of distilled water)		
0.03	0.05	$0.045 \pm 0.02\%$ $s_x = 0.0014$
0.02	0.035	
0.03	0.05	
Results of titration of the extract from raspberry leaves		
0.57	1.00	$1.00 \pm 0.02\%$ $s_x = 0.0033$
0.56	0.99	
0.57	1.00	

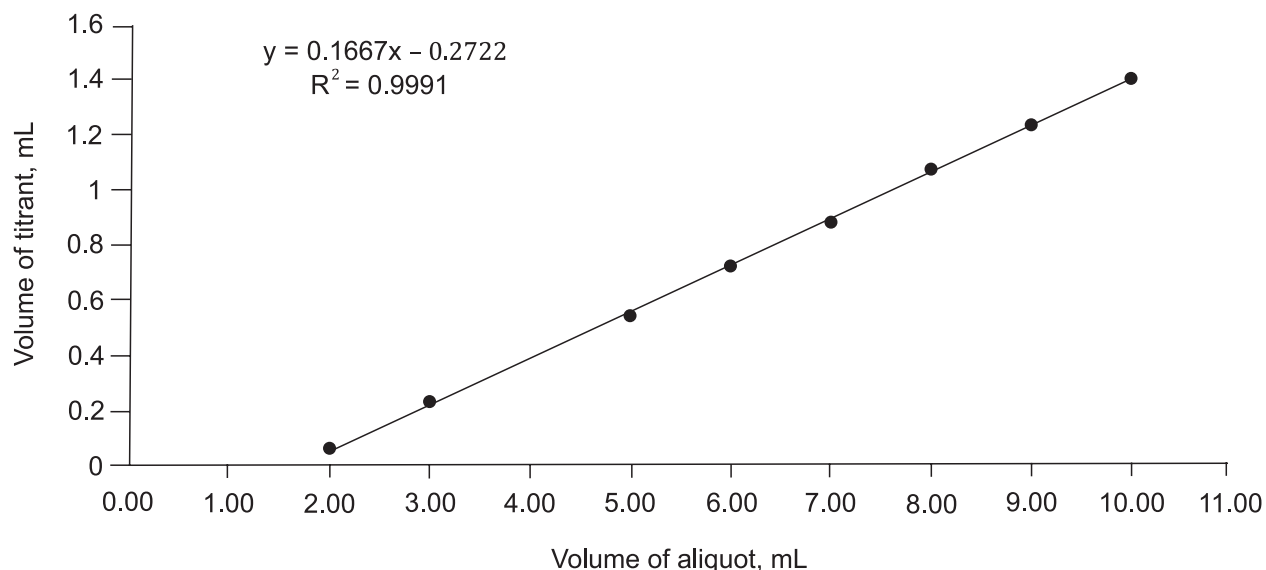


Fig. 2. The calibration curve of the titrant volume vs the volume of an aliquot of the extract prepared

Table 2

Recovery studies by the procedure of standard additions

The amount present, g	The amount of citric acid added, g	The amount of organic acids taken, g	The amount recovered, g	Recovery, %	SD, %	RSD, %
0.019	0.0052	0.0242	0.024	99.17	1.46	1.45
			0.0248	102.48		
			0.0246	101.65		
0.019	0.0134	0.0324	0.032	98.77		
			0.033	101.85		
			0.0326	100.62		
0.019	0.0184	0.0374	0.037	98.93		
			0.0372	99.47		
			0.0378	101.07		

Table 3

Repeatability of organic acids in raspberry leaves

Number of samples	Content of free organic acids, %
1	0.95
2	0.97
3	0.93
4	0.95
5	0.95
6	0.95
Mean, %	0.95
SD	0.0151
Confidence interval (P = 95%), %	0.0120
RSD, %	1.58

The accuracy of the method was assessed using the percentage of recovery and the relative standard deviation. The percentage of recovery was found to be in the range from 98.77 to 102.48%, and its average value was 100.45%, the value of the relative standard deviation when assessing the correctness of the method was 1.45% and did not exceed 2% (Table 2).

The precision of the method was confirmed by repeatability and intermediate precision. The values of RSD for repeatability and intermediate precision were 1.58 and 1.74%, respectively. The RSD values were less than 2%. It proves that the method is precise (Tables 3, 4).

The robustness of the method was determined by changing the analyst and burette. It was found that the RSD values of inter-analyst and inter-burette were

Table 4

Intermediate precision of organic acids in raspberry leaves

Number of samples	Content of free organic acids, %	
	<i>The first day</i>	<i>The second day</i>
1	0.95	0.93
2	0.95	0.93
3	0.93	0.95
4	0.97	0.97
5	0.93	0.95
6	0.95	0.97
Mean, %	0.95	0.95
SD	0.0151	0.0179
Confidence interval (P = 95%), %	0.0120	0.0143
Mean, %	1.59	1.88
Mean RSD, %	1.74	

Table 5

Robustness of organic acids in raspberry leaves

Concentration of organic acids, %	Content of free organic acids, %				RSD, %	
	<i>The first analyst</i>	<i>The second analyst</i>	<i>The first burette</i>	<i>The second burette</i>	<i>Inter-analysts</i>	<i>Inter-burettes</i>
0.95	0.95	0.95	0.97	0.93	1.52	1.37
0.95	0.95	0.95	0.97	0.95		
0.95	0.97	0.93	0.97	0.97		
0.95	0.97	0.93	0.95	0.93		
0.95	0.93	0.93	0.95	0.95		
0.95	0.93	0.95	0.95	0.95		

1.52 and 1.37%, respectively. The RSD values were less than 2%, showing that minor changes in conditions have little effect on the results (Table 5).

Conclusions

The alkalimetric method for the quantitative determination of free organic acids in the raspberry

leaves has been developed and validated according to the following parameters: specificity, linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision, robustness. It has been confirmed that the method is simple, reliable, accurate and cost-effective.

Conflict of Interests: the authors have no conflict of interests to declare.

References

1. Padmanabhan, P.; Correa-Betanzo, J.; Paliyath, G. Berries and Related Fruits. In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B.; Finglas, P. M.; Toldrá, F., Eds. Academic Press: Oxford, 2016; pp 364–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00060-X>.
2. Sariburun, E.; Şahin, S.; Demir, C.; Türkben, C.; Uylaşer, V. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *J. Food Sci.* **2010**, *75* (4), C328–C335. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x>.
3. Velichko, V. V.; Makarova, D. L. Comparative pharmacognostic analysis of leaves and fruit of raspberry ordinary. *Medicine and Education in Siberia* **2015**, *4*.
4. Дергачева, Ж. М.; Гурина, Н. С.; Мушкина, О. В. Фитохимический анализ листьев малины обыкновенной (*Rubi Idaeus Folia*). *Реценз* **2015**, *6*, 64–74. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>.
5. Bobinaitė, R.; Viškelis, P.; Venskutonis, P. R., Chapter 29 – Chemical Composition of Raspberry (*Rubus* spp.) Cultivars. In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*; Simmonds, M. S. J.; Preedy, V. R., Eds.; Academic Press: San Diego, 2016; pp 713–731. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00029-5>.
6. Ferlemi, A.-V.; Lamari, F. N. Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value. *Antioxidants* **2016**, *5* (2), 17. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>.
7. Сергунова, Е. В.; Марахова, А. И.; Аврач, А. С. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях. *Фармація* **2013**, *4*, 8–11.
8. Gu, Y.; Li, J.; Song, W.; Zhang, X. Determination of C₁-C₆ organic acids in the products from syngas to olefins by ion chromatography. *Chinese journal of chromatography* **2014**, *32* (2), 204–209. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1123.2013.09038>.
9. Mortera, P.; Zuljan, F. A.; Magni, C.; Bortolato, S. A.; Alarcón, S. H. Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. *Talanta* **2018**, *178*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.005>.

10. Nogueira, T.; Lago, C. L. d. Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate, and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Microchem. J.* **2011**, *99* (2), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.05.014>.
11. Zhilkina, V. Yu.; Marakhova, A. I.; Stanishevskiy, Ya. M. Qualitative and quantitative analysis of organic acids in mixture of multivitamin raw material. *Drug development & registration* **2016**, *1*, 156–159.
12. Umarov, U. A.; Maslov, O. Y.; Kolisnyk, S. V.; Fathullaeva, M. Development and Validation of The Conductometric Titration Method of Quantitative Determination of Free Organic Acids in The Anise Fruits. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine* **2020**, *7* (3), 3874–3883.
13. Sochorova, L.; Torokova, L.; Baron, M.; Sochor, J. Electrochemical and others techniques for the determination of malic acid and tartaric acid in must and wine. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13* (9), 9145–9165. <https://doi.org/10.20964/2018.09.20>.
14. Strömberg, N.; Sahlin, E. Determination of the short-chain fatty acid pattern in biodiesel using high throughput syringe solvent extraction and ion exclusion chromatography. *Fuel* **2012**, *97*, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.032>.
15. The International Council for Harmonisation. Quality Guidelines. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (accessed Jan 10, 2021), Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
16. *Державна фармакопея України: в 3 т., 2-е вид.*; Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»: Харків, 2015; Т. 1.

Received: 12. 12. 2020

Revised: 14. 01. 2021

Accepted: 23. 01. 2021

ЗМІСТ / CONTENTS

І. Г. Логвиненко, В. Г. Долованюк, І. С. Кондратов ПРЕПАРАТИВНИЙ МЕТОД СИНТЕЗУ 4-(ТРИФЛУОРОМЕТОКСИ)ПІПЕРИДИНУ ТА 4-(ТРИФЛУОРОМЕТОКСИМЕТИЛ)ПІПЕРИДИНУ	3
I. G. Logvinenko, V. G. Dolovanyuk, I. S. Kondratov / The preparative synthetic approach to 4-(trifluoromethoxy)piperidine and 4-(trifluoromethoxymethyl)piperidine	
Г. Г. Яковенко, М. В. Вовк ЗРУЧНІ ПІДХОДИ ДО СИНТЕЗУ 6-АМІНО- ТА 6-ОКСОІМІДАЗО-[4,5- <i>b</i>]ПІРАЗОЛО[3,4- <i>e</i>]ПІРИДИНІВ	10
G. G. Yakovenko, M. V. Vovk / Convenient approaches to the synthesis of 6-amino- and 6-oxoimidazo[4,5- <i>b</i>]pyrazolo[3,4- <i>e</i>]pyridines	
С. Ю. Шейко, А. С. Шаламай THE DETERMINATION OF THE PHYTOCHEMICAL COMPOSITION OF THE ALTAVOR SUBSTANCE	16
С. Ю. Шейко, А. С. Шаламай / Визначення фітохімічного складу субстанції Альтабор	
М. Ye. Blazheyeveskiy, O. V. Koval'ska, K. V. Dynnyk A NOVEL LUMINOL-BASED CHEMILUMINESCENCE METHOD FOR DETECTING ACETYLCHOLINE.....	25
М. Є. Блажеєвський, О. В. Ковальська, К. В. Динник / Новий хемілюмінесцентний метод визначення ацетилхоліну з використанням люмінолу	
О. О. Михайленко, А. Г. Котов, Е. Е. Котова, [Л. М. Сіра], В. М. Ковальов, В. А. Георгіянц РОЗРОБКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦІЇ ПРИЙМОЧОК КРОКУСУ ПОСІВНОГО (ШАФРАН) ДЛЯ ВНЕСЕННЯ У ПРОЄКТ МОНОГРАФІЇ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ.....	32
О. О. Mykhailenko, A. G. Kotov, E. E. Kotova, [L. M. Sira], V. M. Kovalyov, V. A. Georgiants / Development of methods for standardization of <i>Crocus sativus</i> (saffron) stigmas for inclusion in the draft monograph of the State Pharmacopoeia of Ukraine	32
У. А. Умаров, С. В. Колісник, О. В. Колісник, М. Фатхуллаєва, Н. К. Чінібекова, М. М. Хамдамов ВИВЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ТРАВИ АНІСУ ЗВИЧАЙНОГО ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХНЬОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ.....	42
U. A. Umarov, S. V. Kolisnyk, O. V. Kolisnyk, M. Fatkhullaeva, N. K. Chinibekova, M. M. Khamdamov / The study of polyphenolic compounds of <i>Pimpinella anisum</i> herb and determination of their antioxidant activity	
Д. М. Зозулинець, А. Г. Каплаушенко, А. С. Коржова СИНТЕЗ ТА ВЗАЄМОДІЯ З АЛЬДЕГІДАМИ 4-АМІНО-5-(ХІНОЛІН-2-ІЛ)-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОЛУ	48
D. M. Zozulynets, A. G. Kaplaushenko, A.S. Korzhova / The synthesis of 4-amino-5-(quinolin-2-yl)- 4H-1,2,4-triazole-3-thiol and its interaction with aldehydes	
О. Ю. Маслов, С. В. Колісник, Т. А. Костіна, З. В. Шовкова, Е. Ю. Ахмедов, М. А. Комісаренко VALIDATION OF THE ALKALIMETRY METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FREE ORGANIC ACIDS IN RASPBERRY LEAVES.....	53
О. Ю. Маслов, С. В. Колісник, Т. А. Костіна, З. В. Шовкова, Е. Ю. Ахмедов, М. А. Комісаренко / Валідація алкаліметричної методики кількісного визначення вільних органічних кислот у листі малини	