

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КАТИОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕЗО-ТЕТРА-(4-ПИРИДИЛ)ПОРФИРИНА

Н.В. Новиков, аспирант, В.В. Старков, студент,

К.А. Формировский, студент, Н.А. Брагина, доцент, И.П. Ушакова, доцент,

А.Ф. Миронов, заведующий кафедрой

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений

им. Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: nikshabash@mail.ru

Осуществлен синтез амфифильных катионных мезо-пиридилзамещенных порфиринов с длинноцепными заместителями и изучены их свойства. Усовершенствована методика получения тетра-замещенных производных 5,10,15,20-тетра-(4-пиридил)порфирина (ТПП), подобраны условия получения алкилированных монозамещенных ТПП.

Synthesis of amphiphilic cationic meso-pyridylsubstituted porphyrins bearing long chain alkyl groups is described. An improved methods of preparation of tetra- and mono-alkylsubstituted meso-pyridil porphyrins are proposed. The data porphyrins will be investigated as mesogenic compounds and in studing of DNA-binding interactions of cationic porphyrins.

Ключевые слова: катионные порфирины, водорастворимые порфирины, алкилирование

Keywords: cationic porphyrins, water-soluble porphyrins, alkylation

Синтетические порфирины находят все большее применение в технике и медицине, что обусловлено их коммерческой доступностью, легкостью синтеза и модификации, устойчивостью, особыми фотофизическими и электрохимическими свойствами [1]. В последние годы отмечается значительный интерес к использованию амфифильных порфиринов в качестве модельных соединений и новых материалов [2]. Наличие в этих соединениях полярных групп позволяет повысить их растворимость в водной среде, что является важным условием для проведения биологических исследований. Введение длинноцепных гидрофобных заместителей увеличивает сродство подобных порфиринов к плазматической мембране клетки и позволяет им встраиваться в мембранные системы, что открывает возможности для моделирования различных природных процессов [3].

Водорастворимые катионные производные порфиринов обладают высокой биологической активностью и в последние годы активно изучаются в качестве потенциальных терапевтических агентов [4]. Сообщается, что катионные порфирины, в отличие от анионных или нейтральных аналогов, обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных бактерий [5], а также противовирусной и противогрибковой активностью [6, 7]. Показано, что положительно заряженные производные порфиринов способны селективно связываться с нуклеиновыми кислотами и расщеплять их [8], а также накапливаться в митохондриях опухолевых клеток и после активации светом

вызывать их гибель путем апоптоза [9]. Кроме того, катионные производные порфиринов рассматриваются в качестве ингибиторов теломеразы – фермента, отвечающего за «бессмертие» раковых клеток [10].

В литературе описано использование коммерческого катионного 5,10,15,20-тетра-(*N*-метил-4-пиридил)порфирина для различных биологических испытаний, в частности, в качестве агента для фотодинамической терапии рака (ФДТ) [11–13]. Некоторые исследователи используют это соединение как стандарт биологической активности катионных порфиринов. Однако аналогии этого порфирина с длинными алкильными заместителями упоминаются крайне редко [14].

В связи с этим целью данной работы явился синтез катионных мезо-пиридил-замещенных порфиринов с длинноцепными алкильными заместителями и изучение их свойств. Нами была поставлена задача найти эффективные пути синтеза этих соединений, используя возможность функционализации 5,10,15,20-тетра-(4-пиридил)порфирина (1) (ТПП).

Исходный ТПП 1 получали методом монопищевой конденсации [15]. Для получения замещенных порфиринов 2–8 использовали реакцию алкилирования порфирина 1 алкилгалогенидами (Схема 1). В качестве алкилирующих агентов были выбраны алкилбромиды [16]. В литературе сообщалось об использовании алкилбромидов для алкилирования ТПП: в работе [17] удалось при кипячении в диметилформамиде (ДМФА) в течение 4 ч получить смесь из 15% моно-, 25% ди-, 23% три- и 8% тетразамещенных продуктов, которую разделяли гелевой фильтрацией на Sephadex LH-20.

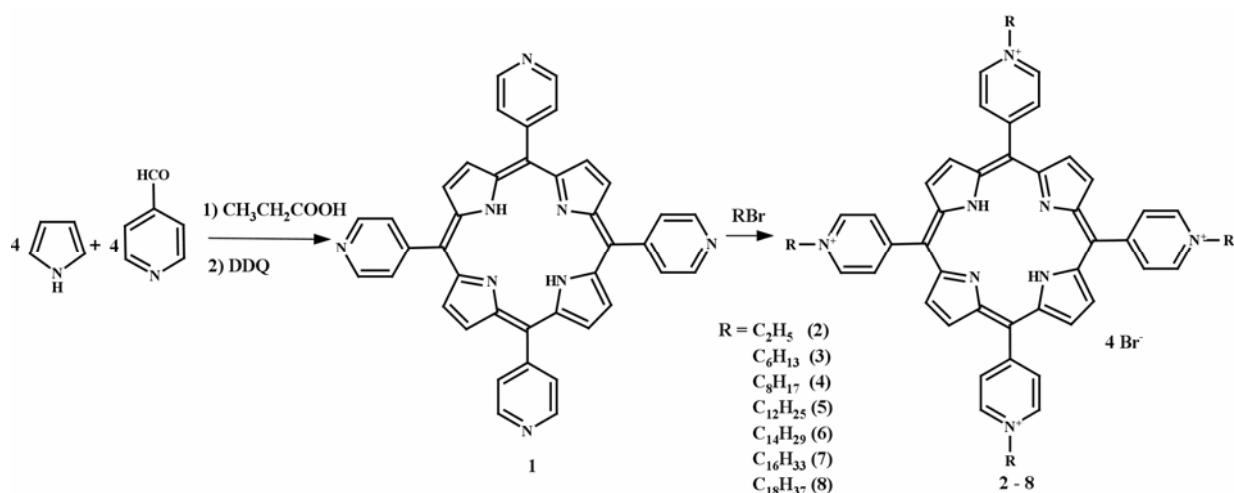


Схема 1. Синтез и последующая модификация 5,10,15,20-тетра-(4-пиридил)порфирина.

Мы усовершенствовали существующую методику [17], значительно увеличили выход целевых *мезо*-тетра-(*N*-алкил-4-пиридил)порфиринов **2–8** и упростили процедуру разделения и очистки, использовали более доступные сорбенты вместо дорогостоящего Sephadex LH-20. В результате проведенных исследований были найдены следующие оптимальные условия алкилирования ТПП **1** длинноцепными алкилбромидами: 1) для реакции используется ДМФА, при этом качество растворителя является определяющим (свежеперегнаный ДМФА над молекулярными ситами 5 Å, без примесей аминов и воды); 2) оптимальное время реакции 2 ч; 3) 40-кратный избыток бромида, обеспечивающий наилучший выход; 4) реакция протекает только при нагревании и, наиболее полно, при кипячении в атмосфере инертного газа. Использование таких условий позволяет получать катионные тетра-*мезо*-пиридил-замещенные порфирины **2–8** с алкильными заместителями с длиной цепи от 6 до 18 углеродных атомов с выходами до 80–90%. При выделении целевых продуктов была использована более доступная окись алюминия вместо дорогостоящего сорбента Sephadex LH-20 (использование силикагеля для данных соединений оказалось малоэффективным).

Индивидуальность полученных порфиринов **1–9** подтверждали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), структуру – с помощью электронных и ¹H-ЯМР-спектров. На спектрах ¹H-ЯМР наличие сигналов протонов в характерной области 8–9 м.д. подтвердило, что замещение в ТПП происходит именно по четырем *мезо*-положениям макроцикла (наблюдали симметричные сигналы, соответствующие протонам в остатках пиридина (два дублета), и сигналы

β-пиррольных протонов (уширенный синглет)); сигналы протонов углеводородных заместителей наблюдали в характерной для них области 0.9–3.8 м.д. Электронный спектр поглощения представлял собой этио-тип спектра. В масс-спектрах наблюдали пики, соответствующие молекулярным ионам порфиринов, замещенным по четырем положениям, и их интенсивность была максимальна.

На следующем этапе работы мы попытались осуществить алкилирование в среде других органических растворителей, обладающих более низкими температурами кипения, по сравнению с ДМФА, устойчивых к окислению и пригодных для растворения исходных реагентов и конечных продуктов. Таким образом, исходя из растворимости исходного ТПП и конечных продуктов алкилирования, нами была выбрана система хлороформ – этанол, 3:1. Было обнаружено, что в данных условиях преимущественно образуются монозамещенные порфирины, например, 5-(*N*-октил-4-пиридил)-10,15,20-трис-(4-пиридил)порфирин (**9**) получали с выходом до 58%. Выходы тетразамещенных продуктов, как и следовало ожидать, были низкими (<6%).

Мы обнаружили, что полученные порфирины **2–8**, в зависимости от длины алкильных заместителей, склонны к растворению в различных растворителях. Несмотря на то, что все они являются амфифильными катионными соединениями, способность растворяться в воде зависит от длины углеводородных радикалов в *мезо*-положениях макроцикла. Так, порфирины **2,3** растворимы в воде в широком интервале pH, а порфирины **4–8** с длиной цепи 8 углеродных атомов и более способны растворяться только в системах хлороформ – метанол – вода.

Таким образом, были отработаны эффек-

тивные пути синтеза амфифильных катионных мезо-пиридилзамещенных порфиринов с длинноцепными гидрофобными заместителями. Сочетание метода монопиррольной конденсации с последующей модификацией мезо-пиридиниевых групп позволило получить водорастворимые амфифильные производные мезо-тетра-(4-пиридин)порфирина, которые переданы для изучения их мезоморфных свойств, а также связывания с ДНК тимуса теленка.

Экспериментальная часть

В работе использовали гидрид кальция, пятиокись фосфора, органические растворители отечественного производства, 4-формилпиридин, пиррол (Merck), карбонат калия (Sigma), алкилбромиды (Acros organics).

Хлороформ и хлористый метилен перегоняли над пятиокисью фосфора, пиррол – над гидридом кальция, ацетон – над карбонатом калия, ДМФА – над гидридом кальция и молекулярными ситами 5Å. Электронные спектры получали на спектрофотометре Jasco UV-7800 (Япония) в смеси хлористый метилен-метанол 2:1. Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре Bruker MSL-300 (ФРГ) с рабочей частотой на ядрах ^1H 300.13 МГц. Измерения химических сдвигов проводили по шкале δ , внутренний стандарт ТМС, растворители CDCl_3 , CD_3OD , D_2O . Элементный анализ выполняли на С, Н, N, S-элементном анализаторе Thermo Finnigan (Италия).

Масс-спектры снимали на приборе Bruker Ultraflex TOF/TOF (ФРГ) методом MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation). ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия), детектировали пятна визуально и обработкой насыщенным раствором KMnO_4 . Хроматографическую очистку соединений проводили на открытых колонках с силикагелем G 60 (Sigma) и оксидом алюминия Al_2O_3 WN-3 Neutral 1-ой степени активности по Брокману (Sigma).

5,10,15,20-Тетра-(4-пиридил)порфирин (1)

К раствору 500 мг (4.67 ммоль) 4-формилпиридина в 5 мл смеси пропионовой и уксусной кислот (70:1) добавляли при перемешивании 313 мг (4.67 ммоль) пиррола и перемешивали при кипячении 2 ч. Из реакционной массы с помощью вакуумной перегонки отгоняли растворитель. Остаток черного цвета смешивали с водой для удаления остатков кислот и фильтровали через складчатый фильтр. Затем смешивали с водным аммиаком и промывали водой до нейтральной реакции среды. Оставшийся на

фильтре осадок смывали смесью метанол – хлористый метилен, 1:10, упаривали и наносили на колонку с окисью алюминия. Элюировали хлористым метиленом. Первая фракция содержала целевое вещество вместе с побочным продуктом. Повторное хроматографирование проводили на колонке с силикагелем. Элюировали системой хлористый метилен – метанол, 10:1. Избыток растворителя удаляли в вакууме. Продукт осаждали из медицинского эфира. Выход 105 мг (14%); R_f 0.73 (хлористый метилен – метанол, 7:3). Электронный спектр (CHCl_3 , λ_{max} , нм, ϵ): 418 ($4.30 \cdot 10^5$); 514 ($18.5 \cdot 10^3$); 549 ($5.6 \cdot 10^3$); 588 ($5.4 \cdot 10^3$); 646 ($2.2 \cdot 10^3$). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 – CD_3OD , 2:1, δ , м.д.): 8.98 (8H, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 8.84 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 8.22 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, β -Py).

5,10,15,20-Тетра-(N-этил-4-пиридил)-порфирин тетрабромид (2)

К раствору 30 мг (0.0485 ммоль) порфирина 1, растворенного в минимальном количестве (2 мл) ДМФА, добавляли при кипячении и перемешивании 1 мл (16 ммоль) этилбромид. Перемешивали при кипячении в атмосфере инертного газа 2 ч. Избыток этилбромида отгоняли. После охлаждения целевой продукт выпадал в осадок, который отфильтровывали, промывали метанолом и осаждали из медицинского эфира. Выход 39 мг (78%). Электронный спектр, λ_{max} , нм: 434; 517; 557; 590; 649. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 – CD_3OD – D_2O , 65:25:4, δ , м.д.): 8.90 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 8.74 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 8.52 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, β -Py), 3.89 (8H, м, CH_2), 1.16 (12H, с, CH_3).

5,10,15,20-Тетра-(N-гексил-4-пиридил)-порфирин тетрабромид (3)

К раствору 30 мг (0.0485 ммоль) порфирина 1, растворенного в минимальном количестве (2 мл) ДМФА, добавляли 40-кратный избыток гексилбромида в количестве 320 мг (1.94 ммоль). В течение 5 мин реакционную смесь продували инертным газом, затем кипятили в течение 2 ч. Полученную реакционную массу разделяли хроматографически на окиси алюминия. Элюировали системой хлористый метилен – метанол, 20:1 для удаления избытка гексилбромида. Целевой продукт элюировали системой хлористый метилен – метанол, 5:1. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток осаждали из медицинского эфира. Выход 56 мг (90%). Электронный спектр, λ_{max} , нм: 435; 522; 558; 594; 650. Спектр ^1H -ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 9.52 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 9.21 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 9.00 (8H, д, $J = 0.2$ Гц,

β -Py), 5.04 (8H, т, α -CH₂), 2.41 (8H, п, β -CH₂), 1.66 (8H, м, γ -CH₂), 1.55 (8H, м, δ -CH₂), 1.33 (8H, м, CH₂), 0.90 (12H, м, CH₃).

5,10,15,20-Тетра-(N-октил-4-пиридил)-порфири́н тетрабромид (4)

Синтез осуществляли аналогично получению соединения **3** взаимодействием 5 мг (0.00808 ммоль) порфирина **1** и октилбромид в количестве 62 мг (0.162 ммоль). Выход 10 мг (91%). Электронный спектр, $\lambda_{\max}$, нм: 436; 526; 563; 597; 654. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD, δ , м.д.): 9.48 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 9.18 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 8.96 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, β -Py), 5.03 (8H, м, α -CH₂), 2.40 (8H, м, β -CH₂), 1.67 (8H, м, γ -CH₂), 1.56 (8H, м, δ -CH₂), 1.26 (24H, м, (CH₂)_n), 0.87 (12H, м, CH₃).

5,10,15,20-Тетра-(N-додецил-4-пиридил)-порфи́рн тетрабромид (5)

Синтез осуществляли аналогично получению соединения **3** взаимодействием 30 мг (0.0485 ммоль) порфирина **1** и додецилбромид в количестве 484 мг (1.94 ммоль). Выход 72 мг (93%). Электронный спектр, $\lambda_{\max}$, нм: 434; 521; 564; 594; 652. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD, δ , м.д.): 9.48 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 9.15 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 8.98 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, β -Py), 5.01 (8H, м, α -CH₂), 2.40 (8H, м, β -CH₂), 1.67 (8H, м, γ -CH₂), 1.34 (64H, м, (CH₂)_n), 0.93 (12H, м, CH₃).

5,10,15,20-Тетра-(N-тетрадецил-4-пиридил)-порфи́рн тетрабромид (6)

Синтез осуществляли аналогично получению соединения **3** взаимодействием 30 мг (0.0485 ммоль) порфирина **1** и тетрадецилбромид в количестве 538 мг (1.94 ммоль). Выход 77 мг (88%). Электронный спектр, $\lambda_{\max}$, нм: 430; 524; 560; 595; 651. Спектр ¹H ЯМР (CD₃OD, δ , м.д.): 9.50 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 9.19 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 9.00 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, β -Py), 5.03 (8H, т, α -CH₂), 2.41 (8H, п, β -CH₂), 1.72 (8H, м, γ -CH₂), 1.60 (8H, м, δ -CH₂), 1.29 (72H, м, (CH₂)_n), 0.88 (12H, м, CH₃).

5,10,15,20-Тетра-(N-гексадецил-4-пиридил)-порфи́рн тетрабромид (7)

Синтез осуществляли аналогично получению соединения **3** взаимодействием 30 мг (0.0485 ммоль) порфирина **1** и гексадецилбромид в количестве 592 мг (1.94 ммоль). Выход 77 мг (86%). Электронный

спектр, $\lambda_{\max}$, нм: 426; 520; 559; 592; 650. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD, δ , м.д.): 9.66 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 9.25 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 9.18 (8H, д, $J = 0.2$ β Py), 5.10 (8H, м, α -CH₂), 2.43 (8H, м, β -CH₂), 1.73 (8H, м, γ -CH₂), 1.58 (8H, м, δ -CH₂), 1.27 (88H, м, (CH₂)_n), 0.91 (12H, м, CH₃).

5,10,15,20-Тетра-(N-октадецил-4-пиридил)-порфи́рн тетрабромид (8)

Синтез осуществляли аналогично получению соединения **3** взаимодействием 30 мг (0.0485 ммоль) порфирина **1** и октадецилбромид в количестве 645 мг (1.94 ммоль). Выход 77 мг (86%). Электронный спектр, $\lambda_{\max}$, нм: 469; 525; 566; 618; 671. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD, δ , м.д.): 9.50 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, α -Py), 9.27 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 9.01 (8H, д, $J = 0.2$ Гц, β -Py), 5.03 (8H, м, α -CH₂), 2.41 (8H, м, β -CH₂), 1.72 (8H, м, γ -CH₂), 1.60 (8H, м, δ -CH₂), 1.29 (104H, м, (CH₂)_n), 0.88 (12H, м, CH₃).

5-(N-Октил-4-пиридил)-10,15,20-трис-(4-пиридил)порфи́рин (9)

К раствору 23 мг (0.0372 ммоль) порфирина **1** в 28 мл смеси хлороформ – этанол, 3:1 добавляли при кипячении и перемешивании 108 мг (0.56 ммоль) 1-бром-октана. Перемешивали при кипячении 56 ч. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле, смесь наносили в хлороформе. Полярность системы постепенно повышали до 25% метанола в смеси хлороформ – метанол, затем элюировали системой хлороформ – метанол – вода, 65:25:4. Полученный продукт концентрировали в вакууме и перекристаллизовали из медицинского эфира. Выход 18 мг (58.4%); R_f 0.71 (хлористый метилен – метанол, 8:2). Электронный спектр, $\lambda_{\max}$, нм: 418; 511; 544; 589; 645. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃ – CD₃OD, 2:1, δ , м.д.): 9.52 (2H, д, α -Py), 9.04 (6H, д, α -Py), 8.87 (8H, ушир. с, β -пиррольн.), 8.89 (2H, д, β -Py), 8.24 (6H, д, β -Py), 4.61 (2H, м, NCH₂(CH₂)₇), 2.07 (2H, м, NCH₂CH₂(CH₂)₆), 1.29 (8H, м, N(CH₂)₃(CH₂)₄CH₂), 1.10 (2H, м, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₅), 0.88 (3H, м, N(CH₂)₇CH₂).

Работа выполнена при финансовой поддержке АБЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» № 2.1.1./2889.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chou, J.H. In: Porphyrin Handbook / J.H. Chou. / Ed. K.M. Kadish [et al.] – Amsterdam : Acad. Press, 2000. – Vol. 6. – P. 346–360.
2. A perspective on four new porphyrin-based functional materials and devices / C.M. Drain [et al.] // J. Porphyrins & Phthalocyanines. – 2002. – Vol. 6. – P. 243–258.

3. Пикуз, С.С. Модельные системы на основе липид-порфириновых ансамблей и липо-порфиринов в биохимических исследованиях / С.С. Пикуз, Ю.Л. Себякин // Биоорг. химия. – 1996. – Т. 22. – С. 725–736.
4. Hudson, R. Lipophilic cationic porphyrins as photodynamic sensitizers – synthesis and structure–activity relationships / R. Hudson, H. Savoie, R. Boyle // Photodiagn. Photodynam. Therapy. – 2005. – Vol. 2. – P. 193–196.
5. Caminos, D. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin / D. Caminos, E. Durantini // Bioorg. Med. Chem. – 2006. – Vol. 14. – P. 4253–4259.
6. Synthesis of cationic β -vinyl substituted *meso*-tetraphenylporphyrins and their *in vitro* activity against herpes simplex virus type 1E / E. Silva [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2005. – Vol. 15. – P. 3333–3337.
7. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin / S. Lambrechts [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. – 2005. – Vol. 79. – P. 51–57.
8. Understanding binding interactions of cationic porphyrins with B-form DNA / D. McMillin [et al.] // Coordination Chem. Rev. – 2005. – № 249. – P. 1451–1459.
9. Irradiated cationic *meso*-porphyrin induces larger damage to isolated rat liver mitochondria than the anionic form / N. Inada [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2007. – № 457. – P. 217–224.
10. Han, F. Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with quadruplex DNA. Structural basis for the differential effects on telomerase inhibition / F. Han, R. Wheelhouse, L. Hurley // J. Am. Chem. Soc. – 1999. – Vol. 121. – P. 3561–3566.
11. Banfi, S. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An *in vitro* study on Gram negative and Gram positive bacteria / S. Banfi, E. Caruso // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. – 2006. – Vol. 85. – P. 28–38.
12. *Meso*-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting / F. Ricchelli [et al.] // Int. J. Biochem. & Cell Biol. – 2005. – Vol. 37. – P. 306–319.
13. Binding modes of V(=O)*meso*-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin to various synthetic DNAs studied by polarized spectroscopy / T.G. Park [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1760. – P. 388–394.
14. Synthesis, characterization and photochemistry of 5,10,15,20-tetrakis(4-N-pentylpyridil)porphyrins, [(TpePyP)H₂]⁴⁺ and [(TpePyP)Zn^{II}]⁴⁺ / H.M. Ajith Herath [et al.] // J. Porphyrins & Phthalocyanines. – 2005. – Vol. 9. – P. 155–162.
15. Аскарлов, К.А. Порфирины: структура, свойства, синтез / К.А. Аскарлов, Б.Д. Березин, Р.П. Евстигнеева / Ред. Н.С. Ениколопан. – М. : Наука, 1987. – 384 с.
16. Титце, Л. Препаративная органическая химия / Л. Титце, Т. Айхер. Пер. с нем. – М. : Мир, 1999. – 704 с.
17. Okuno, Y. An improved synthesis of surfactant porphyrins / Y. Okuno, W.E. Ford, M. Calvin // Chem. Commun. – 1980. – Vol. 10. – P. 537–539.