

СИНТЕЗ ПОЛИКАТИОННОГО ГЕМИНИ-АМФИФИЛА НА ОСНОВЕ СПЕРМИНА

Е.А. Иванова, аспирант, Ю.И. Токарева, студент,
Н.Г. Морозова, доцент, М.А. Маслов, доцент, *В.В. Чупин, профессор

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений

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

*Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

e-mail: mamaslov@mail.ru

Осуществлен синтез поликатионного гемини-амфифила на основе 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерина и природного полиамина – спермина.
The synthesis of a polycationic gemini-amphiphile based on 1,2-di-*O*-tetradecylglycerol and a natural polyamine – spermine – was carried out.

Ключевые слова: катионные липиды, системы доставки, спермин.

Key words: cationic lipids, delivery systems, spermine.

Генная терапия является перспективным подходом для лечения заболеваний, обусловленных генетическими дефектами, а также для терапии и профилактики приобретенных заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания, ревматоидный артрит. В качестве терапевтических молекул в генной терапии используются различные виды нуклеиновых кислот (НК) – ДНК, РНК и олигонуклеотиды. В последние два десятилетия активно разрабатываются методы переноса терапевтического генетического материала в клетки с использованием вирусных или невирусных систем доставки [1–4]. Применение синтетических невирусных систем, например, на основе катионных амфифилов, является предпочтительным, поскольку данные системы более безопасны и просты в обращении, а также доступны в необходимых количествах. Кроме того, молекулы катионных амфифилов могут быть химически модифицированы для увеличения эффективности переноса генетического материала, а также снижения токсичности [5].

Структура катионного амфифила представляет собой комбинацию двух основных доменов – гидрофобного и гидрофильного катионного, которые соединяются спейсерными группами с помощью химической связи определенного типа (линкера). Для повышения эффективности переноса НК проводятся модификации структуры катионных амфифилов, которые включают изменение компоновки структурных единиц и природы катионного или гидрофобного доменов, варьирование спейсерных и линкерных групп. В монокатионных амфифилах в качестве катионных доменов чаще всего используют третичные или четвертичные производные алифатических или гетероциклических азотистых оснований [6, 7]. Поликатионные амфифилы, содержащие в качестве катионного домена природные или синтетические полиамины [8–10], представляют собой альтернативу монокатионным амфифилам. Поликатионные амфифилы

формируют липосомы с большей плотностью поверхностного заряда, что способствует как лучшей компактизации генетического материала, так и накоплению его в эукариотических клетках [11]. Особый интерес представляют гидрофобные производные низкомолекулярных природных полиаминов – спермина или спермидина, которые обладают низкой токсичностью, неиммуногенны и просты в получении. На сегодняшний день на основе спермина созданы эффективные коммерческие препараты для трансфекции эукариотических клеток [12–15].

Уникальность молекулы спермина состоит в наличии симметрии, что позволяет создавать на его основе как классические амфифилы «голова-хвост», так и гемини-амфифилы – соединения симметричной структуры, в которых два гидрофобных домена связаны через спейсерные группы с гидрофильным доменом. Ранее нами была разработана стратегия синтеза как классических амфифилов, так и гемини-амфифилов на основе спермина, в основу которой положена реакция Фукуямы [16, 17]. Полученные с помощью данной стратегии поликатионные гемини-амфифилы содержали в качестве гидрофобного домена остаток холестерина и эффективно доставляли различные типы нуклеиновых кислот в эукариотические клетки [18]. Известно, что в качестве гидрофобных доменов также могут использоваться остатки диглицеридов алкильного и ацильного типов. Было показано, что в ряду производных глицерина с насыщенными длинноцепными углеводородными остатками амфифилы с тетрадецильными заместителями наиболее эффективно доставляют НК в эукариотические клетки [8]. В данной работе нами осуществлен синтез поликатионного гемини-амфифила с гидрофобным доменом на основе 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерина.

Для реализации стратегии на первом этапе было получено бромпроизводное 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерина **4**, в котором спейсерная группа соединена с диглицеридом карбоильной связью (рис. 1).

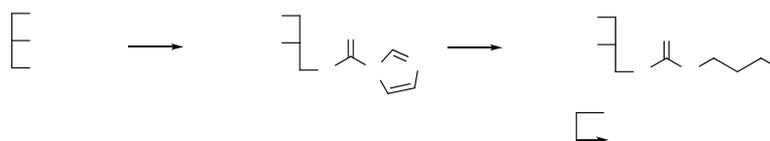


Рис. 1. Синтез бромпроизводного диглицерида **4**. Реагенты и условия:
 а) CDI, Et₃N, 40°C; б) HO(CH₂)₆NH₂, 40°C; в) PBr₃, 40°C.

Исходный 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерин (**1**) обрабатывали *N,N'*-карбонилдиимидазолом в присутствии триэтиламина в среде безводного хлористого метилена. Полученный имидазолид **2** далее вводили во взаимодействие с 6-аминогексан-1-олом, что приводило к гидроксипроизводному **3** с выходом 80%. Замену гидроксильной группы в соединении **3** на атом

брома осуществляли действием тетрабромметана в присутствии трифенилфосфина, и после колоночной хроматографии бромид **4** был получен с выходом 85%.

Для проведения реакции Фукуямы по описанной ранее методике [16] был получен симметричный, защищенный 2-нитробензолсульфонильными группами, спермин **5** (рис. 2).

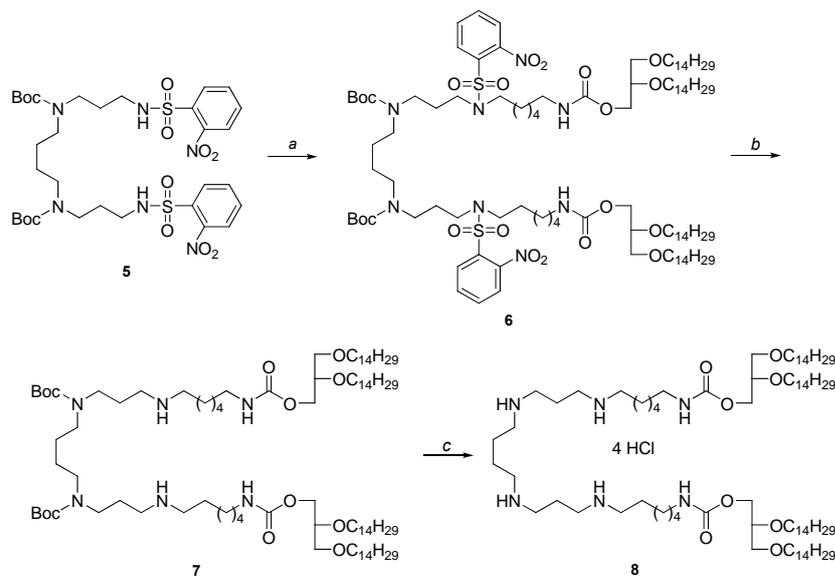


Рис. 2. Получение поликатионного гемини-амфифила **8**. Реагенты и условия:
 а) бромид **4**, Cs₂CO₃, ДМФА, 60°C; б) PhSH, K₂CO₃, ДМФА, 24°C; в) 4 М HCl в диоксане, 24°C.

Ключевым этапом синтеза симметричного поликатионного амфифила **8** явилось *N*-алкилирование бис-сульфонамида **5** бромпроизводным диглицерида **4** в присутствии Cs₂CO₃ в среде безводного ДМФА. После хроматографической очистки соединение **6** было выделено с выходом 44% и охарактеризовано данными масс-спектрометрии, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии. На завершающем этапе осуществляли последовательное деблокирование аминогрупп в соединении **6**. Сначала проводили удаление 2-нитробензолсульфонильной защитной группы действием тиофенола в присутствии K₂CO₃, получая после колоночной хроматографии на силикагеле соединение **7** с выходом 69%. Последующее удаление *трет*-бутоксикарбонильной защиты достигалось обработкой соединения **7** 4 М HCl в диоксане в течение 2 ч, после чего гемини-амфирил **8** осаждали из смеси хлороформ–этанол (1:1) с количественным выходом, его структура была подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Таким образом, нами был синтезирован поликатионный гемини-амфирил, содержащий

в качестве гидрофобного домена остаток 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерина, а в качестве катионного – остаток спермина. Гидрофобные домены присоединены к полиамину через гексаметиленовые спейсеры с помощью карбамильной связи.

Экспериментальная часть

В работе были использованы растворители и реагенты отечественного (Химмед, Реахим) и зарубежного (Merck, Fluka, Aldrich, Acros) производства. Триэтиламин, дихлорметан кипятили над гидридом кальция и перегоняли непосредственно перед реакцией. ДМФА выдерживали над прокаленными молекулярными ситами 4 Å. Синтезы исходных соединений были проведены по известным методикам: 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерин (**1**) [19], 4,9-ди-(*трет*-бутоксикарбонил)-1,12-бис(2-нитрофенилсульфониламино)-4,9-диазадодекан (**5**) [16].

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ и Kieselgel RP-18 F_{254s} (Merck). Обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли действием хлора с по-

следующим проявлением раствором бензидина [20], реагентом «фосформолибденовая кислота – церий(IV) сульфат» с последующим прогреванием [21] и в УФ-свете (254 нм). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Kieselgel 60 (40-63 мкм, Merck). Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре Bruker DPX-300 в CDCl_3 , если не указано другое (внутренний стандарт SiMe_4). Значения химических сдвигов (δ) приведены в миллионных долях (м.д.), КССВ (J) – в Герцах (Гц). Масс-спектры получали на время-пролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex (Bruker Daltonics) методом лазерно-десорбционной ионизации с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в качестве матрицы.

[*rac*-2,3-Бис(тетрадецилокси)пропил]-имидазол-1-карбоксилат (2). К раствору 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерина (1) (1.0 г, 2.063 ммоль) в безводном дихлорметане (20 мл) добавили *N,N'*-карбонилдиимидазол (0.435 г, 2.681 ммоль) и безводный триэтиламин (0.43 мл, 3.094 ммоль). Реакционную смесь кипятили при перемешивании 11 ч. Затем промыли 3%-ной водн. HCl , водой до pH 7, сушили Na_2SO_4 , фильтровали, растворитель упарили. Получили 1.192 г техн. соединения 2.

[*rac*-2,3-Бис(тетрадецилокси)пропил]-*N*-(6-гидроксигексил)карбамат (3). К раствору соединения 2 (2.47 г, 4.27 ммоль) в безводном дихлорметане (35 мл) добавили 6-аминогексан-1-ол (0.75 г, 6.40 ммоль) и кипятили при перемешивании 2.5 ч. Реакционную смесь промыли 3%-ной водн. HCl , водой до pH 7, сушили Na_2SO_4 , фильтровали, растворитель упарили. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир – этилацетат (3:1). Получили 2.14 г (80%) соединения 3. Найдено, %: C 72.60; H 12.17; N 2.13. $\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{NO}_5$. Вычислено, %: C 72.67; H 12.36; N 2.23. Спектр ЯМР ^1H (300 МГц): 0.85 (т, 6 H, J 6.6, 2 CH_2CH_3), 1.20-1.40 (м, 48 H, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.42-1.58 (м, 8 H, 3 OCH_2CH_2 , NHCH_2CH_2), 3.15 (дт, 2 H, J 6.3, J 6.7, NHCH_2), 3.37-3.64 (м, 9 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$, 2 OCH_2CH_2 , CH_2OH), 4.06 (дд, 1 H, J 5.4, J 11.5) и 4.17 (дд, 1 H, J 4.0, J 11.5, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$), 4.62-4.77 (м, 1 H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (75 МГц): 14.49, 23.07, 25.69, 26.42, 26.48, 26.78, 29.75, 29.88, 30.03, 30.08, 30.35, 30.39, 32.30, 32.96, 41.24, 63.12, 64.58, 70.79, 70.97, 72.16, 77.24, 156.84.

[*rac*-2,3-Бис(тетрадецилокси)пропил]-*N*-(6-бромгексил)карбамат (4). К охлажденному до 0°C раствору соединения 3 (0.500 г, 0.796 ммоль) и трифенилфосфина (0.376 г, 1.433 ммоль) в безводном дихлорметане (30 мл) добавили тетрабромметан (0.396 г, 1.194 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 24°C , добавили метанол (10 мл), через 10 мин растворители упарили. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир – этилацетат (10:1). Получили

0.471 г (85%) соединения 4. Найдено, %: C 65.95; H 11.14; N 1.91. $\text{C}_{38}\text{H}_{76}\text{BrNO}_4$. Вычислено, %: C 66.06; H 11.09; N 2.03. Спектр ЯМР ^1H (300 МГц): 0.85 (т, 6 H, J 6.9, 2 CH_2CH_3), 1.15-1.58 (м, 54 H, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, 2 OCH_2CH_2 , $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_3$), 1.78-1.88 (м, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 3.14 (дт, 2 H, J 6.2, 6.9, NHCH_2), 3.36 (т, 2 H, J 6.8, CH_2Br), 3.38-3.63 (м, 7 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$, 2 OCH_2CH_2), 4.06 (дд, 1 H, J 5.3, 11.4) и 4.18 (дд, 1 H, J 3.8, 11.4, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$), 4.64-4.73 (м, 1 H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (75 МГц): 14.50, 23.07, 26.26, 26.42, 26.47, 28.17, 29.75, 29.87, 30.03, 30.07, 30.20, 30.39, 32.30, 32.99, 34.06, 41.26, 64.57, 70.75, 70.95, 72.15, 77.21, 156.77.

11,16-Ди-(трет-бутоксикарбонил)-7,20-бис(2-нитрофенилсульфонил)-1,26-бис{*rac*-[2,3-бис(тетрадецилокси)пропокси]карбониламино}-7,11,16,20-тетраазагексакозан (6). К раствору соединения 7 (0.201 г, 0.260 ммоль) в безводном ДМФА (5 мл) последовательно добавили Cs_2CO_3 (0.175 г, 0.536 ммоль) и бромид 4 (0.590 г, 0.854 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 60°C , добавили хлороформ (8 мл), промыли водным раствором NaCl (3×3 мл), сушили Na_2SO_4 , фильтровали, упарили. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ – метанол (25:0.1), увеличивая полярность до 18:0.1. Получили 0.230 г (44%) соединения 8. Спектр ЯМР ^1H (300 МГц): 0.81 (т, 12 H, J 6.7, 4 CH_3); 1.12-1.42 (м, 96 H, 4 $(\text{CH}_2)_{11}$, 2 $\text{N}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 1.32-1.56 (м, 38 H, 2 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$, 4 OCH_2CH_2 , 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 1.81-1.56 (м, 4 H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.95-3.15 (м, 12 H, 4 $\text{CH}_2\text{N}(\text{Boc})$, 2 CH_2NHCO); 3.15-3.29 (м, 8 H, 4 NCH_2); 3.32-3.70 (м, 14 H, 2 OCH_2CH , 4 OCH_2CH_2); 4.01 (дд, 2 H, J 5.3, 11.5) и 4.12 (дд, 2 H, J 4.3, 11.5, 2 $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 4.58-4.79 (м, 2 H, 2 NHCO); 7.50-7.70 (м, 6 H) и 7.85-7.99 (м, 2 H, 2 C_6H_4). ^{13}C -ЯМР-спектр (75 МГц): 14.25, 22.82, 26.18, 26.24, 26.26, 26.35, 27.50, 28.03, 28.59, 29.49, 29.63, 29.76, 29.79, 29.82, 29.97, 30.15, 32.05, 40.98, 44.67, 45.17, 47.22, 64.35, 70.58, 70.73, 71.91, 77.01, 79.64, 124.28, 130.83, 131.75, 133.59, 133.65, 148.16, 155.54, 156.52.

11,16-Ди-(трет-бутоксикарбонил)-1,26-бис-{*rac*-[2,3-бис(тетрадецилокси)пропокси]-карбониламино}-7,11,16,20-тетраазагексакозан (7). К раствору соединения 8 (0.200 г, 0.100 ммоль) в ДМФА (5 мл) при перемешивании добавили K_2CO_3 (27.6 мг, 0.199 ммоль), а затем PhSH (0.103 мл, 1.000 ммоль). Через 1 ч реакционную массу профильтровали через Celite[®] 545, промыли метанолом, растворитель упарили. После хроматографии на силикагеле в системе хлороформ – метанол (70:1 → 5:1) получили 112.7 мг (69%) соединения 7. Масс-спектр, m/z : 1623.710 [$M + 2\text{H}$]⁺. Спектр ЯМР ^1H (300 МГц): 0.81 (т, 12 H, J 6.7, 4 CH_3); 1.10-1.34 (м, 96 H, 4 $(\text{CH}_2)_{11}$, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.34-1.68 (м, 38 H, 2 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$, 4 OCH_2CH_2 , 2 $\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.69-2.00

(м, 4 Н, 2 NCH₂CH₂CH₂N), 2.50-2.78 (м, 8 Н, 4 NHCH₂); 2.99-3.30 (м, 12 Н, 4 CH₂N(Вос), 2 CH₂NHCO); 3.31-3.64 (м, 14 Н, 2 OCH₂CH, 4 OCH₂CH₂); 4.01 (дд, 2 Н, J 5,4, 11,4) и 4,11 (дд, 2 Н, J 4,2, 11,4, 2 CH₂OC(O)); 4.81 (уш. т, 2 Н, J 5,6, 2 NHCO); 4.89-5.43 (м, 2 Н, 2 NH). Спектр ЯМР ¹³C (75 МГц): 14.12, 22.70, 26.09, 26.15, 26.44, 26.74, 28.48, 29.38, 29.53, 29.68, 29.72, 29.87, 30.07, 31.95, 40.92, 44.41, 47.05, 49.14, 64.26, 70.56, 70.62, 71.80, 76.97, 79.83, 156.4.

1,26-Бис{гас-[2,3-бис(тетрадецилокси)-пропоксикарбониламино]-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид (8)}. К раствору соединения **7** (112.7 мг, 0.069 ммоль) в 4 мл дихлорметана добавили 4 М HCl в диоксане (4 мл) и перемешивали 2 ч при 24°C. Раство-

рители удалили в вакууме, остаток осаждали из смеси хлороформ–этанол (1:1). Получили 85.37 мг (91%) соединения **8** в виде аморфного вещества бежевого цвета. Масс-спектр, *m/z*: 1426.753 [*M* – 4HCl + H]⁺. Спектр ЯМР ¹H (300 МГц): 0.81 (т, 12 Н, J 6,7, 4 CH₃), 1.10-1.39 (м, 96 Н, 4 (CH₂)₁₁, 2 NCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂N), 1.40-1.55 (м, 12 Н, 4 OCH₂CH₂, 2 OCONHCH₂CH₂); 1.58-1.73 (м, 4 Н, NCH₂(CH₂)₂CH₂N), 2.04-2.16 (м, 4 Н, 2 NCH₂CH₂CH₂N), 2.85-3.10 (м, 20 Н, 2 CH₂NHCO, 8 CH₂N), 3.33-3.62 (м, 14 Н, 4 OCH₂CH₂, 2 OCH₂CH), 3.98 (дд, 2 Н, J 5,4, 11,4) и 4.05 (дд, 2 Н, J 4,2, 11,4, 2 CH₂OC(O)).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 10-03-00995-а.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Zhang S.B., Xu Y.M., Wang B., Qiao W.H., Liu D.L., Li Z.S. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery // *J. Control. Release*. 2004. № 100. P. 165–180.
2. El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy // *J. Control. Release*. 2004. № 94. P. 1–14.
3. Klink D., Schindelbauer D., Laner A., Tucker T., Bebok Z., Schwiebert E.M., Boyd A.C., Scholte B.J. Gene delivery systems—gene therapy vectors for cystic fibrosis // *J. Cyst. Fibros*. 2004. № 3. P. 203–212.
4. Rolland A. Gene medicines: The end of the beginning? // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2005. № 57. P. 669–673.
5. Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer // *Adv. Drug. Del. Rev*. 1997. № 27. P. 17–28.
6. Kearns M.D., Donkor A.-M., Savva M. Structure-transfection activity studies of novel cationic cholesterol-based amphiphiles // *Mol. Pharm*. 2008. V. 5. P. 128–139.
7. Bajaj A., Mishra S.K., Kondaiah P., Bhattacharya S. Effect of the headgroup variation on the gene transfer properties of cholesterol based cationic lipids possessing ether linkage // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1222–1236.
8. Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Lehn P. The design of cationic lipids for gene delivery // *Curr. Pharm. Design*. 2005. № 11. P. 375–394.
9. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Катионные амфилилы липидной и нелипидной природы в генной терапии // *Изв. АН. Сер. хим*. 2000. № 3. С. 385–400.
10. Miller A.D. Cationic liposomes for gene therapy // *Angew. Chem., Int. Ed*. 1998. № 37. P. 1768–1785.
11. Stewart L., Manvell M., Hillery E., Etheridge C.J., Cooper R.G., Stark H., van Heel M., Preuss M., Alton E.W.F.W., Miller A.D. Physico-chemical analysis of cationic liposome–DNA complexes (lipoplexes) with respect to *in vitro* and *in vivo* gene delivery efficiency // *J. Chem. Soc., Perkin Trans*. 2001. № 2. P. 624–632.
12. Behr J.P., Demeneix B.A., Loeffler J.P., Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. № 86. P. 6982–6986.
13. Lee E.R., Marshall J., Siegel C.S., Jiang C., Yew N.S., Nichols M.R., Nietupski J.B., Ziegler R.J., Lane M., Wang K.X., Scheule R.K., Harris D.J., Smith A.E., Cheng S.H., Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung // *Hum. Gene Ther*. 1996. № 7. P. 1701–1717.
14. Hawley-Nelson P., Ciccarone V., Gebeyehu G., Jesse J., Felgner P. L. Lipofectamine reagent: A new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent // *Focus*. 1993. № 15. P. 73–79.
15. Петухов И.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез поликатионных липидов на основе холестерина и спермина // *Изв. АН. Сер. хим*. 2010. № 1. С. 254–261.
16. Petukhov I.A., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A. Convenient synthesis of polycationic amphiphiles by the Fukuyama reaction // *Mendeleev Commun*. 2009. № 19. P. 250–252.
17. Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA // *J. Control. Release*. 2011. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.023.
18. Аникин М.В., Ушакова И.П., Серебренникова Г.А., Евстигнеева Р.П. Синтез 1,2-ди-О-алкилглицеринов с использованием алильной защитной группы. – Черкассы, 1987. – Деп. ОНИИТЭИХим. – №915-хп87.
19. Донсон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991.
20. Kritchevsky D., Kirk M.R. Detection of steroids in paper chromatography // *Arch. Biochem. Biophys*. 1952. V. 35. P. 346–351.