



А.Е.Степанов
ведущий научный сотрудник,
В.И. Швец
академик РАМН
заведующий кафедрой
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

РАЗВИТИЕ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КАФЕДРЕ БИОТЕХНОЛОГИИ МОСКОВСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ АКАДЕМИИ ТОНКОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ИМ. М.В.ЛОМОНОСОВА

УДК 547.9:612.397:678.012

Научно-педагогический коллектив кафедры биотехнологии МИТХТ им. М.В.Ломоносова стал формироваться в начале 60-х годов ушедшего столетия, когда в химико-биологическом комплексе наук начали складываться первые представления о фундаментальной роли природных биологически активных липидов в процессах структурной организации, жизнедеятельности и функционировании клетки как основной единицы живых организмов на всех уровнях их организации. В настоящее время общепризнан взгляд на природные липиды как важнейшую группу природных физиологически активных веществ, которые вместе с белками, нуклеиновыми кислотами, углеводами, определяют протекание всех ключевых процессов жизнедеятельности, обеспечивают энергетические потребности организма, придают механическую прочность клеточным структурам. Липиды входят в состав клеточных и субклеточных образований всех известных типов организмов и, будучи главными компонентами природных биологических мембран, действуют в качестве очень чувствительных и специфичных регуляторов физиологического состояния и метаболизма клеток, отвечая на воздействие разнообразных факторов внешней среды; они участвуют в осуществлении межклеточных взаимодействий, проведении нервного импульса и мышечного сокращения, поддержания иммунного статуса организма.

В начальный период становления коллектива активно разрабатывались различные вопросы особенностей строения, химического синтеза, биологических свойств и взаимозависимостей «структура-активность» в ряду фосфолипидов и их конъюгатов с другими типами природных веществ. На этом этапе исследований были предложены основные подходы и реализованы полные химические синтезы большинства типов природных липидов – диглицеридов, гликозилдиглицеридов,

глицеринфосфатидов, полиглицерофосфатидов, инозитфосфатидов, гликофосфолипидов, инозитфосфоцерамидов, фосфатидных кислот, липопептидов и др., т.е. наиболее значимых соединений, ранее практически недоступных для систематического изучения. Одновременно, в сотрудничестве с предприятием «Биолек» (г. Харьков, Украина) выполнен большой цикл работ по созданию рациональных технологий выделения липидных фракций и индивидуальных молекулярных форм липидов из природных биологических материалов растительного и животного происхождения. Это позволило создать материальную основу для постановки системных фундаментальных и прикладных работ по всестороннему изучению веществ липидной природы.

Следующий большой этап в развитии научных исследований кафедры был связан с изучением базовых принципов организации и функционирования клеточных мембран и их надмолекулярных комплексов в составе живых организмов. Эти работы, с учетом специфических особенностей строения и свойств соединений липидной природы, потребовали разработки целого ряда новых методологических подходов на базе методов тонкого органического синтеза, биоорганической и биологической химии, радиоизотопной химии, а также различных физико-химических методов исследования – тонкослойной хроматографии, газовой и высокоэффективной хроматографии, дисперсии оптического вращения, ИК-, ЯМР-, масс-спектрометрии и ряда других. Фундаментальные исследования научной школы, сложившейся на кафедре биотехнологии МИТХТ, во многом способствовали установлению молекулярных основ организации и функционирования клеточных мембран, изучению фосфолипидного бислоя, внесли существенный вклад в формирование современных представлений

об основных функциях фосфолипидов как мембранообразующих молекул и биорегуляторов. Проведенные исследования стали широкой основой для практических медико-биологических разработок по созданию новых лекарственных и диагностических препаратов, в которых фосфолипидные надмолекулярные ансамбли выполняют структурообразующую, а в некоторых случаях и определяющую функционально активную роль. С использованием соединений липидной природы различного типа на кафедре были разработаны уникальные методы и технологии получения серии липосомных медицинских препаратов, биологически активных эмульсий для парентерального питания и комплексных систем для приготовления кровезаменителей, препаратов для лечения онкологических, вирусных заболеваний человека, липидных иммуномодуляторов, веществ общеукрепляющего действия, противотуберкулезных препаратов, диагностикумов и др. (всего внедрено в производство 20 лекарственных, диагностических и биохимических препаратов).

В настоящее время на кафедре активно продолжают работы по конструированию новых, высокоэффективных медицинских препаратов на основе природных и модифицированных липидов. Это липосомные препараты тонизирующего и гепатопротекторного действия – липин, лиолив, противоопухолевые препараты: липодокс (липосомный доксорубин), липофтор (липосомный урацил), липоплат (липосомный цисплатин), липосомный гелиомицин, бетулиновая кислота и ее производные, ретиноевая кислота и ее

производные, противопаркинсонические препараты – липосомные формы L-ДОФА и дофамина, анти-ВИЧ активные препараты для лечения СПИДа – производные азидотимидина, противотуберкулезные препараты - липосомные формы изониазида и рифампицина, липосомный препарат для коррекции геморрагического шока.

Результаты многолетних работ коллектива позволили в настоящее время перейти на более высокий методологический уровень, позволивший сформировать приоритетное научное направление, связанное с изучением основных вопросов строения и функций природных липидных веществ и их надмолекулярных комплексов, разработать новые принципы создания молекулярно-транспортных систем для направленной доставки биологически активных соединений и лекарственных препаратов в клетки-мишени при лечении различных патологий. Новые принципы и методы создания медицинских препаратов для эффективной терапии распространенных болезней человека (онкологические, вирусные, иммунные заболевания), разрабатываемые на кафедре биотехнологии, имеют актуальное значение для общественного здравоохранения и широко востребованы практической медициной. Эти приоритетные результаты нашли отражение в ряде монографий и обзорных работ коллектива школы кафедры биотехнологии [1-8]. Современный научно-методический уровень исследований кафедры в области использования соединений липидной природы для биомедицинского применения представлен в следующей статье данного выпуска.

ЛИТЕРАТУРА:

1. В.И.Швец, А.Е.Степанов, Крылова В.Н., Гулак П.В. “*мио*-Инозит и фосфоинозитиды”. Москва, издательство «Наука». 1987 г. – 248 стр.
2. Stepanov A.E., Shvets V.I., Schmitt L., Spiess B., Schlewer G., Inositol phosphates and derivatives: synthesis, biochemistry and therapeutic potential Издательство American Chemical Society-Book, Department. Washington, DC., 235p.- 1991.
3. А.Е.Степанов, В.И.Швец, Ю.М.Краснопольский. “Физиологически активные липиды”. Москва, издательство “Наука”. 1991 г. – 136 стр.
4. Stepanov A.E., Shvets V.I. //in: Phosphoinositides: chemistry, biochemistry, and biomedical applications. Karol S. Bruzik, editor. Издательство American Chemical Society Books, Washington DC., 298 p.– 1999.
5. А.С. Дудниченко, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец «Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике», Харьков, Издательская группа «РА-Каравелла», 2001, 143 с.
6. Каплун А.П., Ле Банг Шон, Краснопольский Ю.М., Швец В.И. // Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ. Вопросы мед. химии . 1999. – Т.45, N1. – С. 3-12.
7. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. //Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм лекарственных препаратов. Химико-фармацевтический журнал. 1999. – Т.33, N10. – С.20-23
8. А.П.Каплун, И.В.Жигальцев, В.И.Швец. Конструирование лекарств для лечения болезни Паркинсона. Природа, 2000, № 6, с. 68-75.

А.П. Каплун
профессор,
А.Е. Степанов
ведущий научный сотрудник,
В.И. Швец
академик РАМН
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

НАНОЧАСТИЦЫ КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

УДК547.9:612.397:678.012

В статье рассматриваются общие свойства наночастиц как средств доставки лекарственных веществ и некоторые нанопрепараты, разрабатываемые на кафедре Биотехнологии. Было показано, в частности, что липосомные формы ДОФА и дофамина в дозах на порядок меньших, чем соответствующие растворы, дают более выраженный эффект на паркинсонических мышах, и проникают в мозг в 100 раз лучше; липосомный баларпан ускоряет эпителизацию повреждений роговицы в два раза и увеличивают прочность рубца в пять раз по сравнению с раствором.

Сокращения: БК – бетулиновая кислота, в.б. – внутрибрюшинно, ГЭБ – гемато-энцефалический барьер, L-ДОФА – L-диоксифенилаланин, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, Лс – липосомы, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ТЛЧ – твердые липидные частицы, Хол – холестерин, яФХ – яичный

фосфатидилхолин, МРТР – метил-фенил-тетрагидропиридин.

Эффективность медицинских препаратов зависит не только от активности и селективности лекарственной субстанции, но и от лекарственной формы. Как правило, различные лекарственные формы отличаются одна от другой фармакокинетикой. В этом отношении наночастицы уникальны. Преимущества наночастиц перед обычными лекарственными формами часто оцениваются порядками.

Свойства наночастиц

Известны несколько типов наночастиц, которые исследуются как системы доставки лекарств: липосомы, наноэмульсии, твердые липидные частицы (ТЛЧ), полимерные наносферы, полимерные мицеллы, кохлеаты, наносuspensions и др. Каждый из них имеет преимущества и недостатки (табл. 1).

Таблица 1. Физические и биологические свойства некоторых коллоидных систем доставки лекарств (модифицировано из [1])

	Липосомы	Наносuspensions	ТЛЧ	Эмульсии	Полимерные наносферы
Стабильность субстанции	+	++	+	+	+
Стабильность при хранении	+	++	+	+	+
Эффективность загрузки	Низкая	Высокая	Низкая	Высокая	Высокая
Стабильность в организме	+	++	+	+	++
Возможность перорального введения	-	++	++	+	++
Возможность нацеливания	++	++	++	+	+
Безопасность	++	++	++	++	++
Размер частиц, нм	40-1000	50-900	40-900	300-1500	40-100
Легкость масштабирования	+	++	+	++	+
Стерилизация паром	-	++	+	++	+
Стоимость производства	Высокая	Низкая	Низкая	Низкая	Низкая

Уже десятки медицинских препаратов, в которых используются Липосомы [2] и наноэмульсии [3] доступны на фармацевтическом рынке: доксорубин, дауномицин, амфотерицин В, морфин, цитарабин, диазепам, пропופол, циклоспорин А, ритонавир, этомидат. Недавно в США были одобрены для медицинского использования несколько препаратов на основе полимеров: Oncaspar [4], Abraxane [5], Xyotax [6], Rapamune [7].

Главные преимущества наночастиц как систем доставки: эффект пассивного нацеливания, уменьшение токсичности лекарственной субстанции, увеличение биодоступности для плохо растворимых веществ, постепенное высвобождение,

защита лекарственного вещества от преждевременной деструкции.

Важным событием в развитии нанопрепаратов было открытие, что присоединение гибких полярных полимерных цепочек (чаще всего ПЭГ) увеличивает время циркуляции. Такие стерически стабилизированные наночастицы позволяют в наибольшей степени проявиться эффектам пассивного и активного нацеливания [8].

Исследования кафедры «Биотехнология»

На нашей кафедре находятся два десятка липосомных препаратов на различных стадиях исследования (Табл. 2)

Таблица 2. Липосомные препараты, разрабатываемые на кафедре «Биотехнология»

Субстанция	Тип препарата	Стадия разработки
Доксорубин*	Противоопухолевый	Производится на Украине
Цисплатин*	Противоопухолевый	Биологические испытания
Фторурацил*	Противоопухолевый	Биологические испытания
Фосфатидилхолин*	Антигипоксический.	Производится на Украине
Антраль*	Гепатопротектант	Производится на Украине
Сульфатид*	Для лечения гемолитической болезни новорожденных	Закончены биологические испытания
Рифампицин, рифамбутин, изониазид	Противотуберкулезный	Биологические испытания t
L-ДОФА, дофамин* ³	Для лечения болезни Паркинсона	Закончены биологические испытания
Баларпан* ²	Препарат для улучшения заживления поврежденной роговицы	Начаты клинические испытания
Бетулиновая кислота	Противоопухолевый (антимеланомный)	Биологические испытания
Доксорубин + ангистатин* ⁴	Противоопухолевый	Лабораторные исследования

* В сотрудничестве с «Биолек», Харьков, Украина

*² В сотрудничестве с МНТК «Микрохирургия глаза» им. Федорова *³ В сотрудничестве с Институтом Общей Патологии и Патофизиологии РАМН *⁴ В сотрудничестве с Институтом Экологической Медицины

Среди них: препараты для лечения болезни Паркинсона [9,10], препарат для улучшения заживления поврежденной роговицы [11], препараты бетулиновой кислоты и ее производных как антимеланомного средства [12, 13].

Липосомные препараты для лечения болезни Паркинсона

Известно, что причиной болезни Паркинсона является понижение уровня дофамина в стриатуме вследствие

повреждения дофаминэргических нейронов черном теле. Восстановление уровня дофамина стало главной целью терапии болезни Паркинсона [14]. Однако, системное введение дофамина не оказывает никакого влияния на его концентрацию в мозге из-за неспособности проникать через ГЭБ. Поэтому основой лечения болезни Паркинсона остается использование биохимического предшественника дофамина –L-ДОФА [14].

Несколько лет тому назад мы продемонстрировали (Рис. 1), что длительное введение L-ДОФА, инкапсулированного в липосомы, в дозе в 10 раз меньшей

традиционной дозы, приводит к более эффективной компенсации нарушений в поведении паркинсонических мышей, чем в случае раствора L-ДОФА [15].

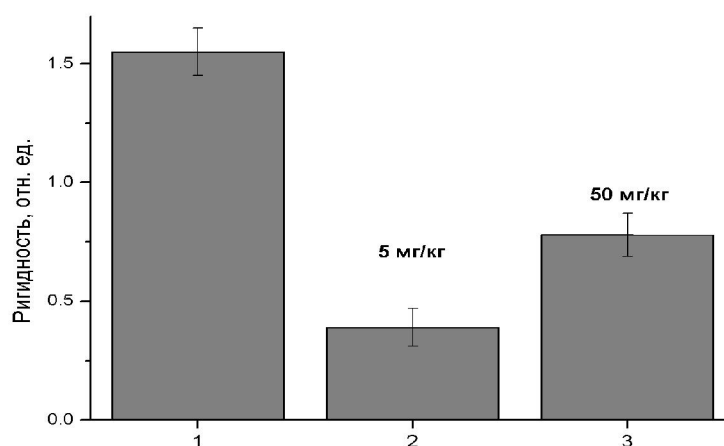


Рис. 1. Уменьшение ригидности у мышей с МРТР-индуцированным синдроме Паркинсона после введения препаратов L-ДОФА: 1. физраствор (контроль); 2 липосомный L-ДОФА; раствор L-ДОФА.

Принимая во внимание тот факт, что способность проникать для многих веществ может быть значительно улучшена введением в липосомной форме [16,17], мы предположили, что инкапсулированный в липосомы дофамин сможет проявлять антипаркинсоническую активность. Мы проверили данное предположение и обнаружили, что, на самом деле, дофамин, загруженный в липосомы, но не раствор дофамина частично восстанавливает биохимические и поведенческие отклонения у мышей с экспериментальным синдромом Паркинсона [18].

Очевидно, что эффект таких липосомных препаратов прямо зависит от содержания дофамина в липосомах. Но обычные методы получения не дают достаточной загрузки в липосомы из-за их малого размера и вытекания субстанции [19]. С другой стороны, было показано, что слабые основания, том числе и некоторые биогенные амины могут быть загружены против градиента концентрации протонов, или сульфата аммония [20,21].

Было исследование влияние состава липосом, концентрации, отношения лекарство/липиды (Табл. 3), гидрофобных и полярных антиоксидантов.

Таблица 3. Характеристики липосом, загруженных дофамином с помощью градиента сульфата аммония.

Начальная концентрация, мг/мл		Отношение дофамин/липиды, ммоль/моль		Доля дофамина в Лс от начального через 24 ч (14 дней), %
Липиды	Дофамин	Начальная	В Лс	
50*	2.5	214	20	10 (8)
20	0.5	107	53	49 (49)
20	1	214	79	37 (39)
50	0.5	42	28	66 (67)
50**	1	85	44	52 (56)
100	0.5	21	19	87 (89)
100	1	42	33	79 (81)

* Липосомы, приготовленные обычной методикой (озвучивание мультисамеллярных липосом), проверенные на их антипаркинсоническую активность.

** Липосомы с увеличенным отношением дофамин/липиды, проверенные на их антипаркинсоническую активность.

Наилучшие результаты были получены для состава яФХ/Хол (7:3, моль/моль), загруженные при 4°C, концентрации липидов 50 мг/мл, концентрации дофамина 1 мг/мл, гидрофобный антиоксидант альфа-токоферол, полярный – бисульфит натрия.

Моноламеллярные липосомы размером 60-100 нм, загруженные дофамином, мы использовали в исследованиях на мышах с МРТР-индуцированным синдромом Паркинсона.

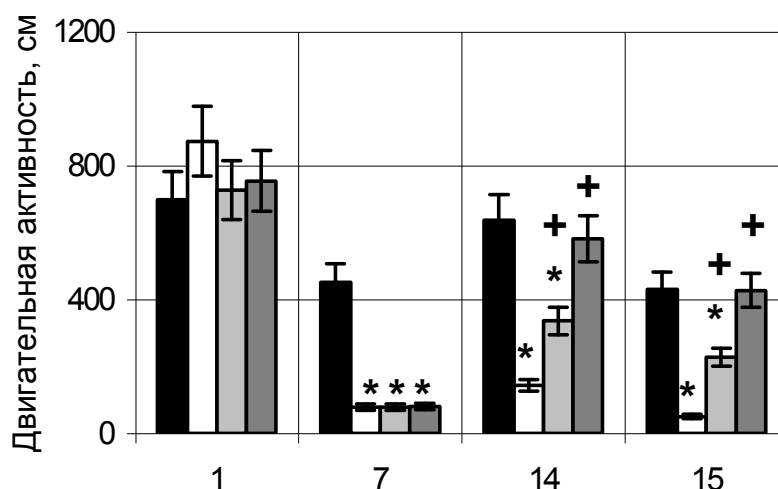


Рис. 2. Эффект внутрибрюшинного введения липосом с увеличенным отношением дофамин/липиды (дофамин 2.5 мг/кг, липиды 250 мг/кг, каждые 12 ч в течении 7 дней) на моторную активность у МРТР-обработанных мышей. Абсцисса периодичность тестирования (1 – перед введением МРТР, 7 – на 7 день введения МРТР (день начала введения липосом), 14 – через 7 дней введения липосом, 15 – 24 ч после последнего введения липосом). Данные приведены как среднее значение и SEM. Статистический анализ проводили с помощью теста ANOVA и t-теста Ньюмана. Статистически достоверные различия обозначены: *, по сравнению с животными, получавшими физраствор ($p < 0.05$); +, по сравнению с МРТР-обработанными животными ($p < 0.05$). Группы животных (по 12 в каждой):

- - мыши, получившие внутрибрюшинно физраствор;
- - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и физраствор;
- ▒ - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и липосомы с физраствором;
- - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и липосомы с дофамином.

Введение раствора дофамина (в.б., 50 мг/кг) никак не повлияла на моторную активность МРТР-обработанных мышей. Введение липосом с увеличенным содержанием дофамина (дофамин 2.5 мг/кг, липиды 250 мг/кг, каждые 12 ч в течении 7 дней) значительно увеличивало двигательную активность на 7 день инъекций липосом; и антипаркинсонический эффект наблюдался в течении 24 ч после последней инъекции (рис.2)

Было также показано, что, как и ожидалось, длительное введение раствора дофамина не приводило к какому-либо эффекту на уровень его и его метаболитов в стриатуме.

Введение приготовленных обычным образом дофамин содержащих липосом (дофамин 3.5 мг/кг, липидов 500 мг/кг, каждые 12 ч в течение 14 дней) увеличивало

уровень дофамина в стриатуме на 40%. Концентрация в стриатуме ДОФУК (признак внутриклеточного метаболизма дофамина) и ГВК (критерия постсинаптической биотрансформации дофамина) через 14 дневного введения увеличивались в 2.6 и 1.7 раза соответственно. Введение же липосом с увеличенным отношением дофамин/липиды (дофамин 2.5 мг/кг, липиды 250 мг/кг, каждые 12 ч 7 дней) приводило к полной компенсации дефицита дофамина в стриатуме (рис. 3А). Концентрация в стриатуме ДОФУК и ГВК после семидневного введения увеличивается в 18 и 8.5 раз (рис. 3В). Приведенные данные подтверждают, что двукратное увеличение отношения дофамин/липиды приводит к более чем четырехкратному увеличению уровня дофамина в стриатуме (рис. 3А)

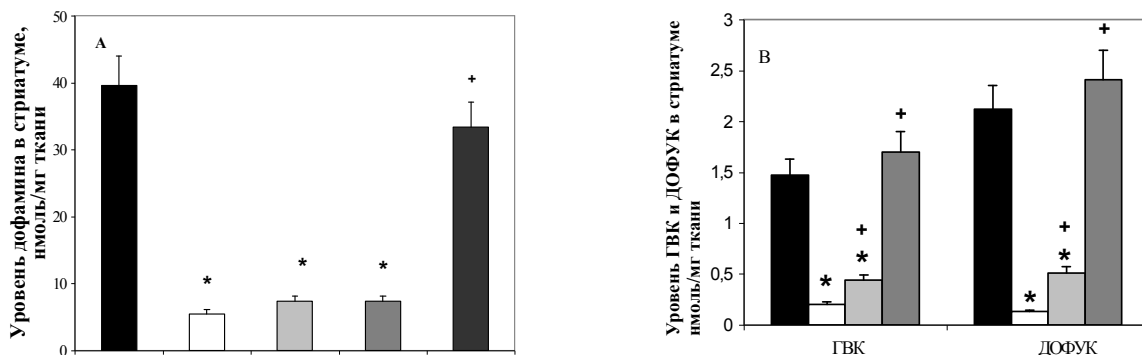


Рис. 3. Уровень дофамина (А) и его метаболитов: ГВК и ДОФУК (В) в стриатуме МРТР-мышей. Дофамин, ГВК и ДОФУК определяли с помощью ВЭЖХ/ЭД после 7 дней введения липосом с увеличенным отношением дофамин/липиды. Статистический анализ проводили с помощью теста ANOVA и t-теста Ньюмана. Статистически достоверные различия обозначены: *, по сравнению с животными, получавшими физраствор ($p < 0.05$); +, по сравнению с МРТР-обработанными животными ($p < 0.05$). Группы животных (по 12 в каждой):

■ - мыши, получившие внутрибрюшинно физраствор;

□ - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и физраствор;

▒ - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и липосомы с физраствором;

■ - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и стандартно приготовленные липосомы с дофамином.

■ - мыши, получившие внутрибрюшинно МРТР и липосомы с дофамином с увеличенным отношением дофамин/липиды

В то же самое время липосомы, содержащие только физраствор, демонстрировали некоторый положительный эффект, включая повышение двигательной активности (рис. 2), и вероятно, модуляцию высвобождения дофамина из выживших нейронов (рис. 3). Это явление было подробно описано нами ранее [22].

Таким образом, описанные результаты показывают, что увеличение отношения дофамин/липиды позволяет значительно уменьшить дозу, как липидов, так и дофамина, необходимой для подавления симптомов болезни Паркинсона. Увеличение отношения дофамин/липиды в липосомах позволяет сократить период введения липосом с 14 до 7 дней и пролонгировать терапевтический эффект до 24 ч.

Полученные данные можно рассматривать как биохимическое доказательство преимущества липосом как системы для доставки дофамина в мозг. Наши результаты показывают, что существует специфические механизмы, которые облегчают проницаемость в мозг для субстанций, инкапсулированных в липосомы. Наиболее вероятный механизм облегченного проникновения наночастиц через ГЭБ – рецептор- опосредованный

транцитоз [23]. Остается неясным, какие рецепторы могут узнавать наночастицы. Сопоставляя два известных факта: любые наночастицы улучшают прохождение загруженного в них вещества и все типы наночастиц подвергаются в крови опсонизации, можно предположить, что именно какие-то опсонины имеют рецепторы на эндотелии капилляров мозга. Не исключено, что ЛПНП или их белки могут сорбироваться на наночастицах, что, и приводит к транцитозу наночастиц через эндотелий, так как рецепторы для ЛПНП присутствуют на эпителиальных клетках [24].

Липосомный препарат для лечения повреждений роговицы

Важная проблема, возникающая после операций на глазах, быстрая и эффективная эпителизация роговицы. Мы обнаружили, что нанесение липосомной формы баларпана приводит к лучшим результатам по сравнению с использованием его раствора. Так, после кератотомии в глаза кроликов закапывал раствор баларпана или липосомный баларпан. В последнем случае предел прочности на разрыв более чем в 5 раз превышал таковой после обработки глаз раствором баларпана (рис. 4).

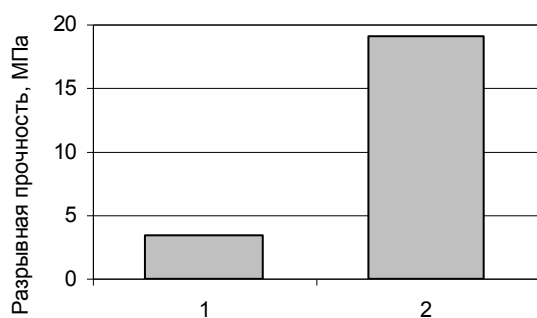


Рис. 4. Предел разрыва на прочность рубца роговицы после кератомии с инстилляцией раствора баларпана (1) и липосомного баларпана (2)

Нанесение липосомного баларпана после фоторефрактивной кератектомии увеличивало скорость эпителизации роговицы вдвое по сравнению с раствором (рис. 5). Наблюдаемые эффекты, вероятно, являются следствием того, что баларпан в липосомах остается в ране более длительное время чем баларпан, введенный в виде раствора. Электронные микрофотографии поврежденной роговицы даже после 2 ч после инстилляцией липосом, меченных серебром, они наблюдаются между слоями коллагена (рис. 6). Это подтверждает нашу гипотезу о роли липосом как депо в экстрацеллюлярном матриксе роговицы.

Закапывание дисперсии пустых липосом приводило к умеренному эффекту по сравнению с раствором баларпана так

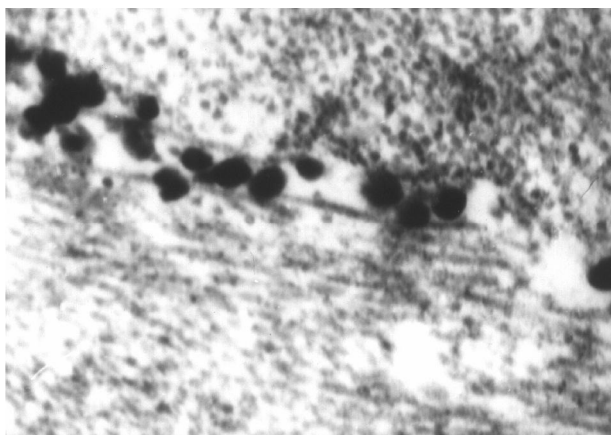


Рис. 6. Меченные серебром липосомы (200 нм) в строме роговицы через 2 ч после инстилляцией на поврежденную роговицу.

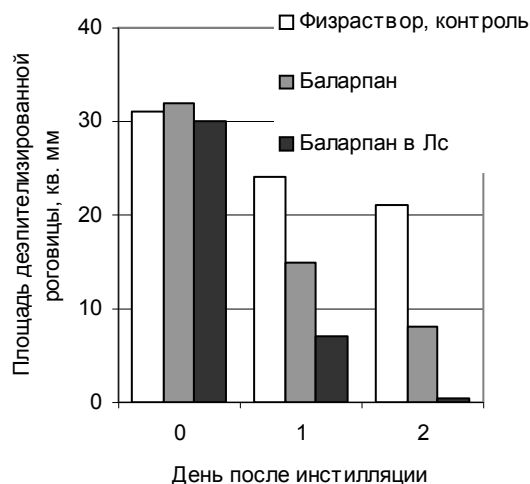


Рис. 5. Уменьшение площади деэпителизированной роговицы после фоторефрактивной кератектомии

же, как и в случае введения пустых липосом паркинсоническими мышам.

Солюбилизация плохо растворимых субстанций

На кафедре также исследуются способы солюбилизации плохо растворимых веществ с помощью нанотехнологий. Мы обнаружили общую закономерность для дисперсий смесей гидрофобных субстанций и фосфолипидов: при использовании значительной доли субстанции (начиная с определенной мольной доли) кроме липосом образуется дополнительный тип наночастиц.

Эта тенденция наблюдалась для гелиомицина (рис. 7), бетулиновой кислоты (рис. 8), производных хлорина e_6 , рифампицина

В типичном опыте мы готовили липосомные препараты упариванием раствора липидов и вещества в хлороформе с последующей гидратацией и фильтрацией через мембраны с порами 400 нм, и затем продавливали через мембраны с порами 200 нм 19 раз. После фильтрации мы наблюдали преципитат на фильтре при максимальных долях вещества. В преципитате определяли количество липидов и субстанции. Рис. 7 показывает, что до 15% мольных весов гелиомицин оказывается в липосомах. После этого доля гелиомицина в липосомах падает. Параллельно появляется осадок. Отношение гелиомицин/липиды в осадке

варьируется от 49/51 до 72/38.

Для бетулиновой кислоты были получены подобные результаты (Рис.8). В этом случае отношение субстанция/липиды изменялось от 27/72 до 45/55. Мы

предположили, что преципитат, образующийся при приготовлении липосомных дисперсий, может использоваться как система доставки лекарств. Поэтому были такие нанодисперсии приготовлены специально.

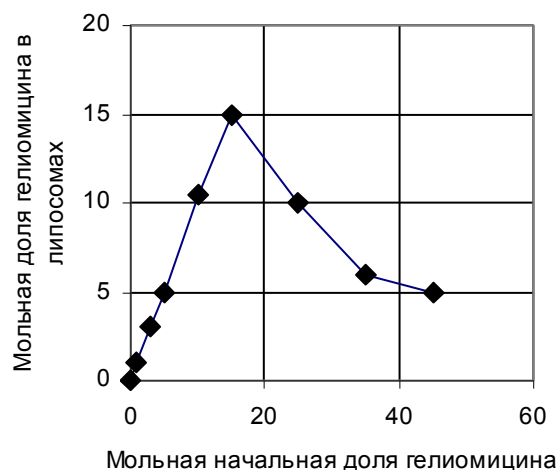


Рис. 7. Зависимость мольной доли гелиомицина в липосомах (яФХ/Хол, 7/3 моль/моль) от мольной доли гелиомицина в начальной смеси.

Как показано на рис. 9, наименьшие частицы образовывались при эквимолекулярном соотношении яФХ/БК. На электронных микрофотографиях видны стержни 18-24 нм в диаметре (рис. 10). Дисперсии других

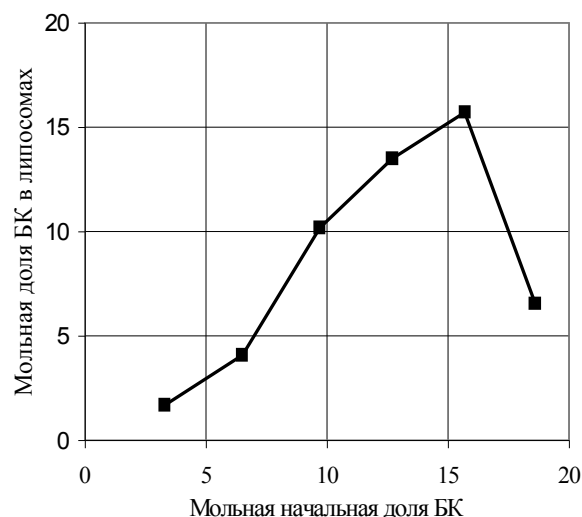


Рис. 8. Зависимость мольной доли бетулиновой кислоты в липосомах (яФХ/Хол, 8/2 моль/моль) от мольной доли бетулиновой кислоты в начальной смеси.

лупановых производных (эпи-бетулиновая кислота, бетулоновая кислота, бетулин, лупан) давали наночастицы другой морфологии. Некоторые из них представляли собой устойчивые дисперсии

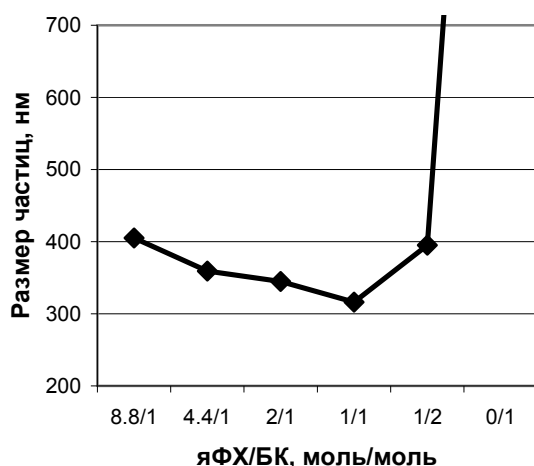


Рис. 9. Размер частиц в дисперсиях яФХ/БК при различном мольном отношении.

С другой стороны мы нашли технологию приготовления стабильных нанодисперсий, состоящих из наносфер тритерпеноидов в аморфном состоянии с

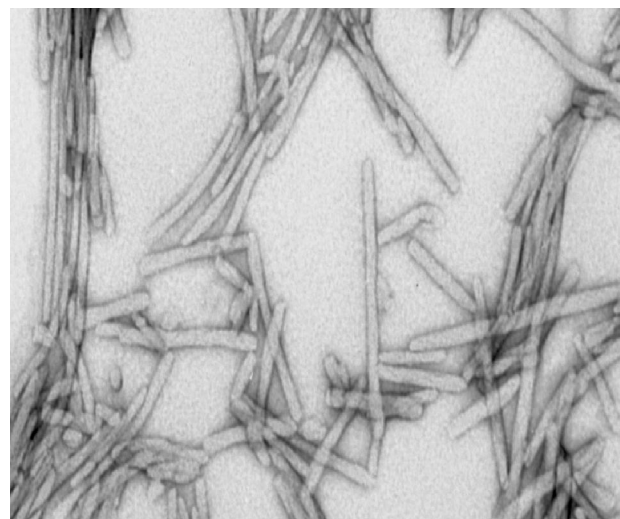


Рис. 10. Электронная микрофотография (негативное контрастирование уранил ацетатом) нанодисперсий яФХ/БК (1/1 моль/моль).

размером частиц 40-130 нм (рис. 11). Все полученные наночастицы имеют очень большую эффективность включения, особенно последние — аморфные наносферы.

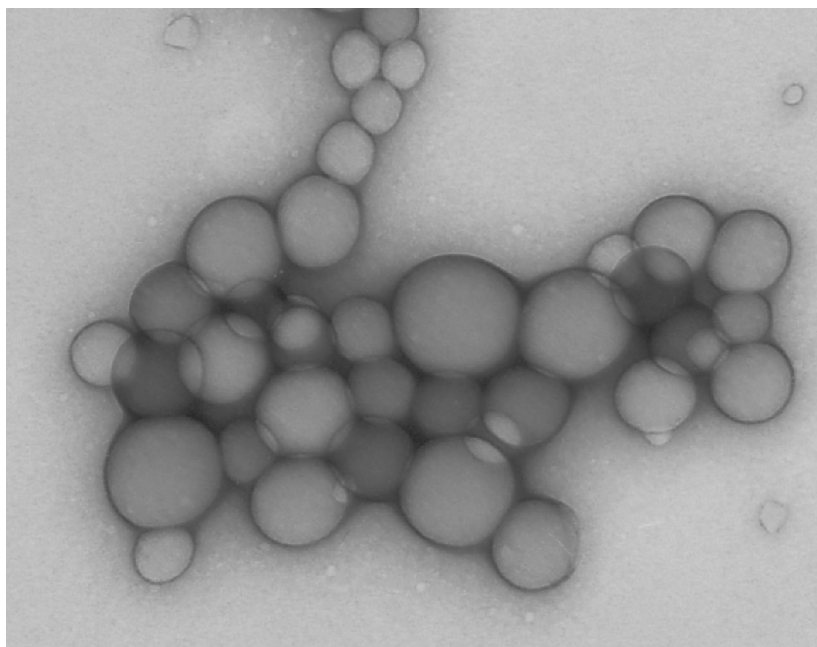


Рис. Электронная микрофотография (негативное контрастирование уранил ацетатом) нанодисперсий лупановых тритерпенидов

Заключение

Количество нанопрепаратов на мировом фармацевтическом рынке растет довольно медленно. Одна из главных проблем конструирования наночастиц – соответствие субстанции носителю. Различные типы веществ нуждаются в различном типе носителей. Нужно учитывать соответствие полярности, молекулярной массы, формы молекул, распределение полярных и гидрофобных участков в молекулах субстанции и носителя. До сих пор подбор носителя, подходящего данной субстанции, в основном происходит эмпирически. Мощным инструментом для предсказания совместимости субстанции и носителя может стать компьютерная симуляция с

помощью методов молекулярной динамики надмолекулярных агрегатов [25,26].

Увеличение эффективности наночастиц как средств доставки лекарств связано с улучшением селективности доставки в мишень: ткань, орган, клетку, компартмент клетки. Это может быть достигнуто активным нацеливанием. Недавно, первый иммунотоксин Mylotarg [27], был принят в США для лечения одного из видов лимфом. Для активного нацеливания наночастиц остался один шаг.

Другим важным направлением для улучшения селективности является контролируемое высвобождение лекарства из наночастиц. Так, pH-зависимый выход молекул ДНК из эндосом резко улучшает эффективность трансфекции [28,29].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kayser O., Kiderlen A.F. (2003) Delivery strategies for antiparasitics. // Expert Opin. Investig. Drugs V. 12. P. 1-11
2. Allen T., Cullis P., (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. Science. V. 303 P. 1818-1822
3. Tamilvanan S. (2004) Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. Progr. Lipid Res. V. 43. P. 489-533.
4. Duncan R, Vicent M.J., Greco F., Nicholson R.I. (2005) Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. Endocr. Relat. Cancer. V. 12 Suppl 1: S189-199.
5. ABRAXANE [prescribing information]. Schaumburg, Ill: Abraxis Oncology, a Division of American Pharmaceutical Partners, Inc; January 2005.
6. Singer J.W., Shaffer S, Baker B, et al. (2005) Paclitaxel poliglumex (XTYOTAX; CT-2103): an intracellularly targeted taxane. Anti-Cancer Drugs. V. 16. P. 243-254.
7. Farrell R., Heaney D., Giovannoni G. (2005) Emerging therapies in multiple sclerosis. Expert. Opin. Emerg. Drugs. V. 10(4). P. 797-816.
8. Moghimi S.M., Szebeni J. (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Progr. Lipid Res. V. 42. P. 463-478

9. Iurasov V.V., Podgornyi G.I., Kucherianu V.G., Kudrin V.S., Nikushkin E.V., Zhigaltsev I.V., Sandalov Iu.G., Kaplun A.P., Shvets V.I., Kryzhanovskii G.N. (1996) The effect of liposomal form of L-Dopa on the level of dopamine, its metabolites, and phospholipid metabolism in the striatum of mice with experimental parkinsonian syndrome [Article in Russian] *Biull. Eksp. Biol. Med.* V. 122(12). P. 614-617.
10. Zhigaltsev I.V., Kaplun A.P., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Kolomeichuk S.N., Shvets V.I., Yurasov V.V. (2001) Liposomes containing dopamine entrapped in response to transmembrane ammonium sulfate gradient as carrier system for dopamine delivery into the brain of parkinson mice. *J. Liposome Res.* V.11. N 1. P. 55-71
11. Багров С.Н., Новиков С.В., Каплун А.П., Лозинская О.Л. Препарат для лечения заболеваний и повреждений рогавицы Патент РФ, №2172026. 2002
12. Ле Банг Шон, Каплун А.П., Шпилевский А.А., Андия-Правдивый Ю.Э., Алексеева С. Г., Григорьев В.Б., Швеи В.И. (1998) Синтез бегулиновой кислоты из бегулина и исследование ее солубилизации с помощью липосом. *Биоорган. химия* 1998 Т. 24. № 10. С. 787-793.
13. Сымон А.В., Веселова Н.Н., Каплун А.П., Власенкова Н.К., Федорова Г.А., Лютик А. И., Герасимова Г.К., Швеи В.И. Синтез циклопропановых производных бегулиновой и бегулоновой кислот и их противоопухолевая активность. (2005) *Биоорган. хим.* 2005 Т. 31. С.320-325
14. Koller W.C., Paulson G. (Eds.). *Handbook of Parkinson's Disease*. Marcel Dekker, New York. 1990.
15. Кучеряну В.Г., Юрасов В.В., Крьжановский Г.Н., Никушкин Е.В., Жигальцев И.В., Каплун А.П., Швеи В.И. (1997) Влияние L-DOPA и его липосомальной формы на развитие паркинсонического синдрома у мышей. *Бюллетень эксперим. биол. и медицины*. 1997.-Т. 123. N 1. С. 29-33.
16. Yagi K., Naoi M., Sasaci H., Abe H., Konishi H., Arichi S. (1982) Incorporation enzyme into the brain by means of liposomes of novel composition. *J. Appl. Biochem.* V. 4. P. 121-125.
17. Mori N., Sato T., Kumashiro H. (1992) Anticonvulsant effect of systemically administered GABA-containing liposomes in rats induced to seizure by amygdaloid electrical stimulation. *J. Lipid Res.* V. 2. P. 49-55.
18. Yurasov V.V., Kucheryanu V.G., Kaplun A.P., Zhigaltsev I.V., Nikushkin E.V., Shvets V.I., Kryzhanovsky G.N. (1997) Dopamine encapsulated in liposomes exerts antiparkinsonian effects in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine-treated mice, *Proc. of the 24th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials*, Stockholm, Sweden, P. 477-478.
19. Борисова Н. В., Крюков В. И., Каплун А. П., Швеи В. И. (1996) Физико-химические свойства боратных производных DOPA, допамина и их липосомальных форм *Биоорган. химия* 1998 Т. 24. № 11. С. 856-863.
20. Nichols J.W., Deamer, D.W. (1976) Catecholamine uptake and concentration by liposomes pH gradients. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 455. P. 269-271.
21. Cullis P.R., Hope M.J., Bally M.B., Madden T.D., Mayer L.D., Fenske D.B. (1997) Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1331. P. 187-211.
22. Yurasov V.V., Kucheryanu V.G., Podgorni G.N., Kudrin V.S., Kaplun A.P., Zhigaltsev I.V., Shvets, V.I. (1997) Biochemical Effects of Conventional Liposomes in Mice Brain, *Proc. of the 25th Int. Symp. Controlled Release of Bioactive Materials*, Las Vegas, USA, P. 394-395.
23. Cornford E. M., Cornford M. E. New systems for delivery of drugs to the brain in neurological disease. *Lancet Neurology* (2002) V. 1. P. 308-315
24. A New Function for the LDL Receptor: Transcytosis of LDL across the Blood-Brain Barrier. Dehouck B., Fenart L., Dehouck M.-P., Pierce A., Torpier G., Cecchelli R. *J. Cell Biol.* V. 138. (1997) P. 877-889
25. Anezo C., de Vries A. H., Holtje H.-D., Tielema D. P., Marrink S.-J. Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations. (2003) *J. Phys. Chem. B.* V. 107, P. 9424-943
26. Marrink S.-J., de Vries A. H., Mark A. E.. Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. (2004) *J. Phys. Chem. B.* V. 108, P. 750-760
27. Larson R.A., Sievers E.L., Stadtmauer E.A., Lowenberg B., Estey E.H., Dombret H., Theobald M., Voliotis D., Bennett J.M., Richie M., Leopold L.H., Berger M.S., Sherman M.L., Loken M.R., van Dongen J.J., Bernstein I.D., Appelbaum F.R. (2005) Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer.* V. 104(7). P. 1442-1452.
28. Cheung C. Y., Murthy N., Stayton P. S., Hoffman A. S. (2001) A pH-Sensitive Polymer That Enhances Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer. *Bioconjugate Chem.* V. 12, P. 906-910.
29. Masson C., Garinot M., Mignet N., Wetzer B., Mailhe P., Scherman D., Bessodes M. (2004) pH-Sensitive PEG lipids containing orthoester linkers: new potential tools for nonviral gene delivery. *J. Contr. Rel.* V. 99. P. 423-434

Д. А. Безруков*аспирант,***Т. Г. Баландин****младший научный сотрудник,***С. М. Деев****заведующий лабораторией,***В. В. Попенко*****ведущий научный сотрудник,***А. П. Каплун***профессор,**кафедра Биотехнологии**МИТХТ им. М.В. Ломоносова***лаборатория молекулярной иммунологии,**Институт биоорганической химии**им. Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН****Институт молекулярной биологии РАН***ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К
КОНСТРУИРОВАНИЮ СЛОЖНЫХ
ЛИПОСОМНЫХ СИСТЕМ
ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ**

УДК 547.9:612.397

Рассматриваются проблемы, возникающие при конструировании сложных нацеленных липосомных систем доставки с контролируемым высвобождением. На примере получения термочувствительных, стерически стабилизированных, нацеленных с помощью барстара, активно загруженных доксорубицином липосом предлагается возможный путь их решения.

Список сокращений: DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин; DSPC – дистеароилфосфатидилхолин; DSPE – дистеароилфосфатидилэтаноламин; Mal – малеимид; PEG – полиэтиленгликоль.

Несмотря на то, что липосомы исследуются как средство доставки лекарств уже 40 лет, и на фармацевтическом рынке уже более десятка липосомных лекарственных препаратов, проблем, связанных с их получением, не уменьшается. Это связано в первую очередь с тем, что современные липосомные препараты представляют собой довольно сложные конструкции. Так как лекарственные препараты, как правило, не имеют сродства к мишени, например, к клеткам опухолей, первоначально исследовались конъюгаты, в которых молекула эффектора была присоединена непосредственно к нацеливающему лиганду. Для увеличения числа молекул лекарственного вещества,

доставляемого в клетку-мишень, в качестве средства доставки используются липосомы. Но эффективность липосомных препаратов часто намного ниже, чем можно было ожидать, так как значительная часть введенных липосом захватывается макрофагами. Для устранения этого недостатка были разработаны липосомы с увеличенным временем циркуляции (за счет т.н. стерической стабилизации).

Гидрофильная оболочка подобных липосом (наиболее часто используется полиэтиленгликоль) ограничивает их распознавание и захват клетками ретикуло-эндотелиальной системы, что приводит к аккумуляции липосом в опухолевой ткани за счет эффекта пассивного нацеливания.

Важно, чтобы лекарственное вещество надежно удерживалось внутри липосом и вместе с тем выходило (желательно с регулируемой скоростью) из липосом при достижении ткани или органа-мишени. Для этой цели используют липосомы с контролируемым высвобождением, к примеру, термо- и pH-чувствительные липосомы, имеющие достаточно жесткую мембрану при нормальных (физиологических) условиях, но при повышении температуры (в случае термочувствительных липосом) или

понижении pH среды (для pH-чувствительных), свойственных опухолевым тканям, проницаемость мембраны таких липосом резко увеличивается. Термочувствительные липосомы состоят, как правило, из таких липидов как DPPC, DSPC и др. [1, 2], в состав pH-чувствительных липосом вводят липиды, форма молекул которых меняется при изменении pH [3]. Особенно интересны такие липосомы в случае активного нацеливания на опухолевые клетки с неравномерным распределением мишеней. Клетки, не экспрессирующие или экспрессирующие недостаточное количество маркеров-мишеней, могут быть уничтожены в результате высвобождения эффектора из липосом, связавшихся с поверхностью соседних клеток.

Активное нацеливание состоит в присоединении какого-либо специфично нацеливающего начала к поверхности липосом, что усиливает взаимодействие с клетками и тканями, через связывание с соответствующими маркерами, присутствующими на поверхности этих клеток. Существуют различные стратегии для присоединения подобного молекулярного адреса к поверхности липосом. Молекула может быть присоединена к гидрофобному якорю как непосредственно, так и через спейсер. Строение и длина спейсера очень важны, и выбираются таким образом, чтобы исключить препятствия к взаимодействию с маркером со стороны полимерных цепей, осуществляющих стерическую стабилизацию липосомы.

Широкие возможности представляют конструкции, в которых к ПЭГ-цепи присоединяют молекулу, способную образовывать прочный комплекс с соответствующим партнером (авидин-биотин [4], барстар-барназа [5]). Такие липосомы являются универсальными конструкциями, к которым можно присоединять различные молекулярные адреса, зонды и т. п.

Помимо методов увеличения селективности и накопления липосом в

тканях-мишенях, параллельно развивались методы получения липосом с увеличенной загрузкой лекарственного вещества. Один из них – активная загрузка, при которой вещество загружается в уже сформированные липосомы под воздействием градиента pH [6] или сульфата аммония [7]. При этом процент включившегося вещества может достигать 99% и более от исходного количества при соотношении лекарственное вещество/липид 0.1–0.3, что недостижимо в большинстве случаев для методов пассивной загрузки. Но, хотя активная загрузка и увеличивает количество попадающих в липосому молекул лекарства, нередко этот метод (что подтверждается и нашими экспериментами) приводит к ухудшению последующего высвобождения, например, в случае активной загрузки доксорубицина с использованием градиента сульфата аммония. Поэтому представляется целесообразным использовать активную загрузку при создании липосом, рассчитанных на интернализацию в клетки-мишени.

Таким образом, можно представить себе «идеальную», или близкую к таковой, липосомную конструкцию, которая включает в себя собственно липосому, максимально загруженную лекарственным веществом, к поверхности которой присоединены: полиэтиленгликолевые цепи для увеличения времени циркуляции, причем на концах некоторых находятся молекулы «молекулярного адреса» для избирательного связывания с клеткой-мишенью, а для дополнительной эффективности в мембрану может быть инкорпорирован белок слияния, обеспечивающий высвобождение содержимого липосомы в цитозоль. Желательно также, чтобы полиэтиленгликолевые цепи, предохраняющие липосому от опсонизации в крови, не мешали бы ее контакту с мембраной клетки-мишени. Одним из решений этой проблемы является

присоединение молекул полиэтиленгликоля к молекуле фосфатидилэтаноламина через легко гидролизуюмую связь. Сочетание перечисленных особенностей данной конструкции приводит к тому, что получение липосом становится нетривиальной задачей. Более того, дополнительные ограничения накладывает выбранный способ загрузки липосом.

К примеру, при попытке получения термочувствительных, нацеленных, активно загруженных липосом может возникать сразу целый ряд проблем. В нашей работе при конструировании липосомной системы доставки к полиэтиленгликолевому спейсеру мы присоединяли белок барстар (~10 кДа), ингибитор рибонуклеазы барназы, образующий с ней комплекс с константой связывания порядка 10^{-14} М. Применение данного подхода дает возможность создать систему доставки с высокой степенью универсальности, т. к. позволяет к уже готовой липосомной дисперсии добавлять различные полученные генноинженерными методами белковые "молекулярные адреса", состоящие из барназы, обеспечивающей их связывание с модифицированной липосомой, и, собственно, подходящей нацеливающей части – фрагмента антитела, рецепторного лиганда, метки и т. п.

Однако высокая лабильность барстара в кислых условиях раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (рН 5.5), используемого для создания градиента, обеспечивающего активную загрузку, не позволяет вводить белково-липидный конъюгат на этой стадии получения липосом. Кроме того, и на следующей стадии активной загрузки его введение представляется нецелесообразным. Дело в том, что основным компонентом термочувствительных липосом является DPPC, температура фазового перехода которого составляет 41.5°C. Активная

загрузка возможна при температуре фазового перехода и выше, но нагревание может приводить к потере активности белка.

Для решения возникших проблем нами была выбрана следующая схема. Первоначально экструзией получают липосомы, содержащие сульфат аммония. После отделения невключившейся соли, в инертной атмосфере при нагревании к липосомной дисперсии добавляется раствор доксорубина и раствор, содержащий мицеллы PEG(2000)-DSPE и малеимидного производного PEG(3400)-DSPE, таким образом, одновременно производится активная загрузка действующего вещества и инкорпорация в бислой липосом липидов с полиэтиленгликолевыми цепочками (т. н. метод "post-insertion"), осуществляющих стерическую стабилизацию и являющихся спейсером для нацеливающего белка. Данный метод имеет еще одно преимущество: если белково-липидный конъюгат вводится на стадии формирования липосом, значительная его часть (до 50%) может встроиться в бислой с внутренней стороны липосомы, тем самым делая бесполезными соответствующие молекулы ценного белка, тогда как при выбранном нами подходе белок присоединяется к соответствующим спейсерам только на следующей стадии, практически полностью оказываясь на внешней поверхности липосомного бислоя.

Далее уже при комнатной температуре в соответствующем буфере происходит присоединение SH-группы белка к малеимидному производному в соответствии с методикой [8].

Электронные микрофотографии (рис. 1) показывают значительное количество связанных с липосомой молекул барстара, хотя их число и меньше расчетного, что объясняется, по-видимому, не 100% выходом реакции конъюгации.

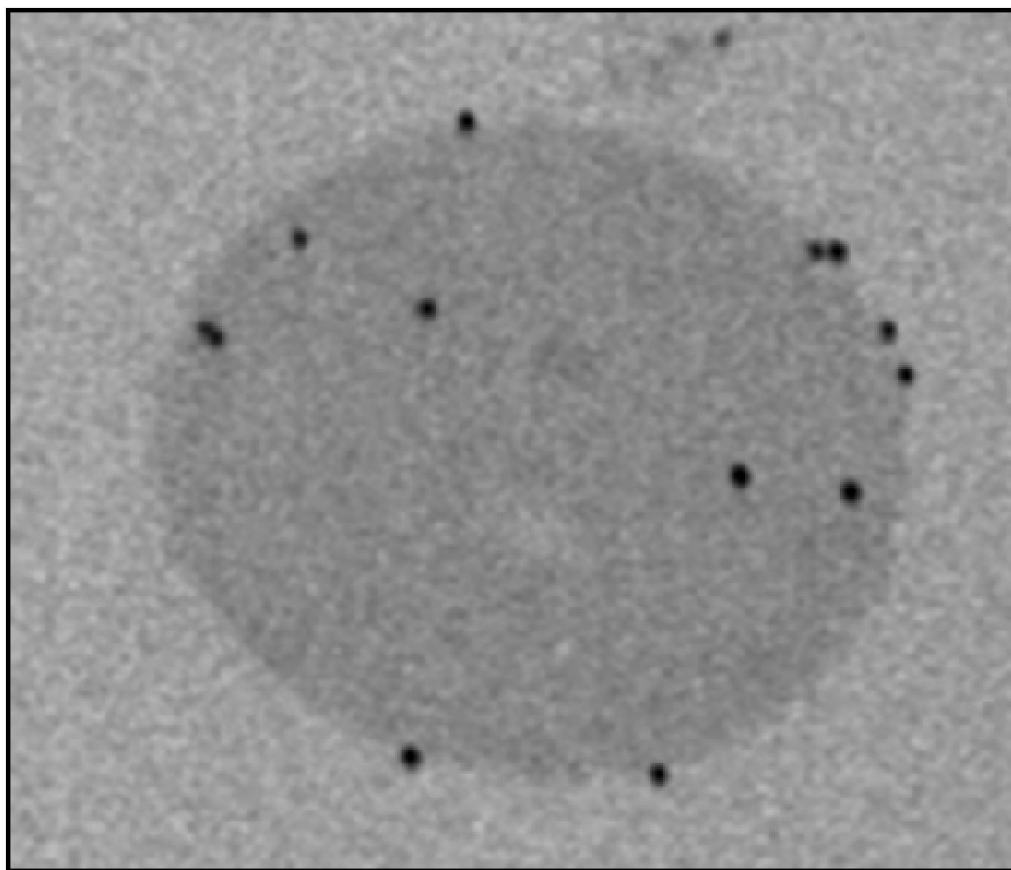


Рис. 1. Электронная микрофотография липосомы с присоединенными мишенями (в качестве мишеней – частицы коллоидного золота, связанные с барназой).

Таким образом, разработанная последовательность операций позволяет получать термочувствительные стерически стабилизированные липосомы, способные присоединяться к субстанциям, несущим барназу.

Материалы и методы

В круглодонную колбу объемом 25 мл поместили 32.5 мг дипальмитоил-фосфатидилхолина (спиртовой раствор) и 7.7 мг холестерина (хлороформный раствор), а также 4.6 мг PEG(2000)-DSPE (хлороформный раствор). Растворители удаляли на роторном испарителе, высушивали в вакууме, после чего в колбу добавляли 1 мл профильтрованного через фильтр 100 нм 250 мМ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 5.5). Содержимое колбы пятикратно замораживали-оттаивали.

Полученную липосомную дисперсию 19 раз продавливали в нагретом до 60°C экструдере LiposoFast (Avestin, Inc.) через ядерную мембрану с диаметром пор 200

нм и на колонке Sephadex G-25 отделяли от невключившегося сульфата аммония. Элюировали буферным раствором (10 мМ HEPES-Na, 135 мМ NaCl, pH 7.4), наличие липосом в отбираемых по 0.5 мл фракциях определяли спектрофотометрически. В круглодонную колбу объемом 25 мл помещали 1.4 мг Mal-PEG(3400)-DSPE и 3.7 мг PEG(2000)-DSPE в виде хлороформного раствора (отношение Mal-PEG(3400)-DSPE/PEG(2000)-DSPE 1/4 по молям). Растворитель удаляли на роторном испарителе и высушивали липиды в вакууме. Сухие липидные пленки, содержащие Mal-PEG(3400)-DSPE гидратировали 1 мл указанного деоксигенированного буфера под аргоном при осторожном перемешивании и нагревании до 60°C. Полученный раствор мицелл смешивали с липосомами, одновременно в липосомную дисперсию вносили 3 мг доксорубина (деоксигенированный буфер), после чего смесь осторожно

перемешивали под аргоном при температуре 60°C в течение 1 часа.

К липосомам в деоксигенированном буфере добавляли 0.8 мг белка. Реакцию проводили в соответствии с методикой [8]. После добавления белка pH доводили до 7.3-7.4 и оставляли на ночь при комнатной температуре под аргоном при осторожном перемешивании. Свободные малеимидные группы блокировали реакцией с избытком β -меркаптоэтанола в течение 30 мин при комнатной температуре.

Невключившийся в липосомы доксорубин отделяли гель-фильтрацией на колонке Sephadex G-25. В качестве элюента использовали физраствор. Профиль элюции липосом с доксорубином контролировали спектрофотометрически. Липосомы с молекулярным адресом собирали в свободном объеме колонки. Количество доксорубина определяли после разрушения аликвоты липосомной дисперсии метанолом по поглощению на 492 нм (эффективность включения доксорубина более 98%).

ЛИТЕРАТУРА:

1. J. Wells, A. Sen, S.W. Hui. Localized delivery to CT-26 tumors in mice using thermosensitive liposomes// *Int. J. Pharm.*, 2003, V. 261, P. 105-114
2. M. H. Gaber, K. Hong, S. K. Huang, D. Papahadjopoulos. Thermosensitive Sterically Stabilized Liposomes: Formulation and in vitro Studies on Mechanism of Doxorubicin Release by Bovine Serum and Human Plasma// *Pharm. Res.*, 1995, V. 12, No. 10, P. 1407-1416.
3. J. M. Kim, D. H. Thompson. Acid and Oxidatively Labile Vinyl Ether Surfactants: Synthesis and Drug Delivery Applications// Marcel Dekker, New York, Basel, 2001, P. 145-154.
4. T.M. Allen, C. B. Hansen, D. D. Stuart, Targeted sterically stabilized liposomal drug delivery// P. Lasic (Ed.), *Medical Applications of Liposomes*, Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 297– 323.
5. S.M. Deyev, R. Waibel, E. N. Lebedenko, A. P. Schubiger, A. Pluckthun, Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module// *Nature Biotechnology*, 2003, V. 21, No 12, P. 1486-1492.
6. N.D. Santos, K. A. Cox, C. A. Mc Kenzie, F. van Baarda, R. G. Gallagher, G. Karlsson, K. Edvards, L. D. Mayer, C. Allen, M. B. Bally. pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol// *Biochem. Biophys. Acta*, 2004, V. 1661, P. 47-60
7. G. Haran, R. Cohen, L.K. Bar, Y. Barenholz. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposome produce efficient and stable entrapment of amphipatic weak basis// *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, V. 1151, P. 201-215
8. T.P. Derksen, G. L. Scherphof, An improved method for covalent coupling of proteins to liposomes// *BBA*, 1985, V. 814, P. 151-155.

Г.Д. Гунгарова
аспирант,
А.И. Давыдова
студент группы БС-69,
Ю.Г. Кириллова
ассистент,
В.И. Швец
академик РАМН
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ АНАЛОГОВ 2'-ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ: 2',3'-ДИДЕЗОКСИАДЕНОЗИНА И 2',3'-ДИДЕЗОКСИГУАНОЗИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТИОГЛИКОЗИДОВ

УДК 547.857.5'455.466'16

ВВЕДЕНИЕ.

Аналоги 2'-дезоксинуклеозидов являются важным классом медицинских агентов, проявляя антиопухолевую и антивирусную активность. Подобные соединения широко используются в терапии вирусных заболеваний, в частности ВИЧ-инфекций, ингибируя синтез вирусной ДНК. В связи с этим прямой синтез аналогов 2'-дезоксинуклеозидов по-прежнему остается актуальной задачей. Широко используемым синтетическим подходом для получения нуклеозидов и их аналогов является модификация силильного метода. Полярные и малорастворимые гетероциклические основания под действием силилирующего агента превращают в липофильные, термически стабильные бис(силилированные) основания, которые затем вводят в реакцию конденсации с остатками замещенной рибозы в присутствии активирующего

агента. В ходе реакции образования гликозидной связи наличие аномерного атома углерода в рибофуранозном кольце обуславливает получение смеси α - и β -аномеров. Значительный интерес представляет реакция гликозилирования с использованием в качестве гликозидного донора 2'-дезоксирибозы, причем отсутствие 2'-направляющей группы приводит к получению смеси аномеров, что снижает выход целевого продукта, β -аномера.

ОБСУЖДЕНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ.

Ранее в нашей лаборатории были получены соединения 2',3'-дидезокситимидин **1** и 3'-фтор-2',3'-дидезокситимидин **2** (рис.1) прямой конденсацией по Форбрюгену [2], с использованием в качестве гетероциклического пиримидинового основания тимина в присутствии катализатора Фриделя-Крафтса $(\text{CH}_3)_3\text{SiSO}_2\text{CF}_3$.

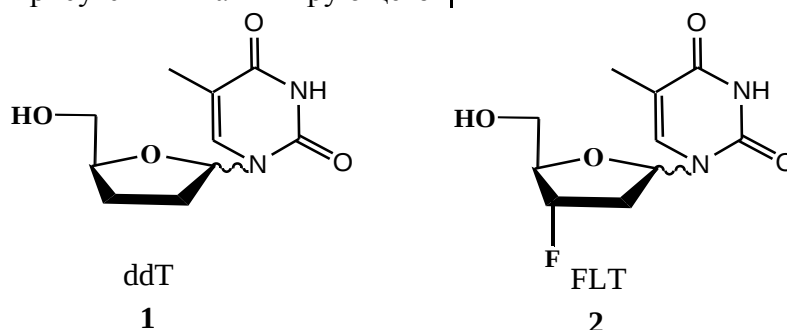


Рисунок 1.

Однако, как было показано [3,4], тиогликозиды являются более эффективными гликозидными донорами для образования гликозидной связи в различных условиях при активации соответствующим агентом в отличие от

ацетилгликозидов. N-Бромсукцинимид использовали для активации тиогликозидов в нейтральных условиях. Данный факт получил экспериментальное подтверждение на примере получения соответствующих соединений **1**, **2** [5]. В ходе исследования

реакцию гликозилирования проводили в следующих условиях: силилированное (основание), NBS, MS 4Å, CH₂Cl₂, -78°C, Ag, что объясняется приведенным ион-парным механизмом [4]. В качестве защитной группы была выбрана *трет*-бутилдифенилсилильная группа, поскольку объем заместителя в 5'-положении рибофуранозного кольца влияет на соотношение α- и β-аномеров в получаемой смеси. Использование в качестве растворителя хлористого метилена, несмотря на низкую растворимость в нем полярных гетероциклических оснований, а следовательно снижение значения выхода, оправдано возможностью проведения реакции при низких температурах, что является необходимым условием для увеличения соотношения аномеров в получаемой смеси в сторону целевого β-аномера. Снижение селективности при использовании в качестве растворителя ацетонитрила подтверждает предполагаемый ион-парный механизм реакции. Полярный растворитель действуя на ионные интермедиаты, способен вызывать диссоциацию ионных пар и привести к снижению количества β-аномера.

Далее, отработанный метод конденсации был применен нами для получения целевого 2',3'-дидезоксиаденозина **8** и 2',3'-дидезоксигуанозина **10**. Синтез пуриновых нуклеозидов в ходе реакции гликозилирования отчасти осложнен тем, что помимо образования смеси α/β аномеров, также образуются региоизомеры по N-7 положению. Кроме того, низкая селективность в реакциях с пуриновыми основаниями объясняется стерическими затруднениями, объемная молекула пурина уменьшает вероятность атаки в β-положение интермедиата. Для того чтобы исключить образование нежелательных N⁷ изомеров, на *экзо* 2-аминогруппу аденина и 6-оксо группу гуанина были введены объемные защитные группы (Схема 1). В случае с аденином была использована бензоильная защитная группа [6]. Силилированный 2-N-Bz-аденин **6** вводили в реакцию конденсации с тиогликозидом **5** в следующих условиях: NBS, MS 4Å, CH₂Cl₂, при -78°C, в атмосфере инертного газа. Поскольку

ранее было известно [7], что N⁷-изомер является кинетическим продуктом реакции гликозилирования, в то время как N⁹-изомер преимущественно термодинамическим, предполагалась зависимость стереоселективности реакции от времени проведения процесса. При проведении реакции конденсации в течение 2-х часов получали смесь α/β аномеров N⁹-изомера **8** и **9** в соотношении 1:1 с выходом 42%. В результате увеличения реакционного времени до 5 часов получали преимущественно β-N⁹-изомер **8**, структура которого была подтверждена данными ¹H-ЯМР спектроскопии. Суммарный выход α/β аномеров составил 45%.

Сигналы соответствующие протонам H-8, 1'-H и 4'-H показали значения химического сдвига (δ): 8,32 (9α) и 8,34 (9β), 6,38 (9α) и 6,39 (9β), 4,56-4,28 (9α) и 4,59-4,29 (9β) м.д., что указывало на отсутствие N⁷ изомеров, поскольку согласно литературным данным, химические сдвиги для протонов изомеров по 9-му положению располагаются в области сильных полей относительно сигналов изомеров по 7-му положению. Точное соотношение аномеров в смеси уточняется. Отнесение сигналов α- и β-аномеров было сделано на основании описанных спектров ddA и аденозина [7,8].

С целью решения задачи региоселективности использовали введение объемной защитной группы по 6-О кислороду гуанина. Обработка защищенного 2-N,9-диацетилгуанина дифенилкарбомойл хлоридом, с последующим гидролизом при нагревании в водно-этанольной смеси приводила к получению 2-N-ацетил-6-О-дифенилкарбамоилгуанина [9]. Силилирование производного гуанина проводили кипячением с N,O-бистриметилсилилацетамидом в дихлорэтаноле. Производное гуанина **7** вводили в реакцию конденсации с тиогликозидом **5** в аналогичных условиях. В результате реакции получали преимущественно β-аномер N⁹-изомера **10**, структура которого была подтверждена данными ¹H-ЯМР спектроскопии. Точное соотношение аномеров уточняется. Суммарный выход α/β аномеров составил 29%. Отнесение сигналов α- и β-аномеров было сделано на основании описанных спектров для гуанозина

[7] и 3'-фтор-2',3'-дидезоксигуанозина полученного ранее в нашей лаборатории [10].

Таким образом, в ходе исследования были подобраны условия для проведения реакции конденсации силилированных пуриновых гетероциклических оснований 6 и 7 с тиогликозидом 5. Были сделаны

выводы, что в реакционной смеси отсутствовали региоизомеры по седьмому положению на основании данных ^1H -ЯМР спектроскопии. Введение объемных защитных групп создает стерические препятствия для образования побочного продукта, изомера N⁷

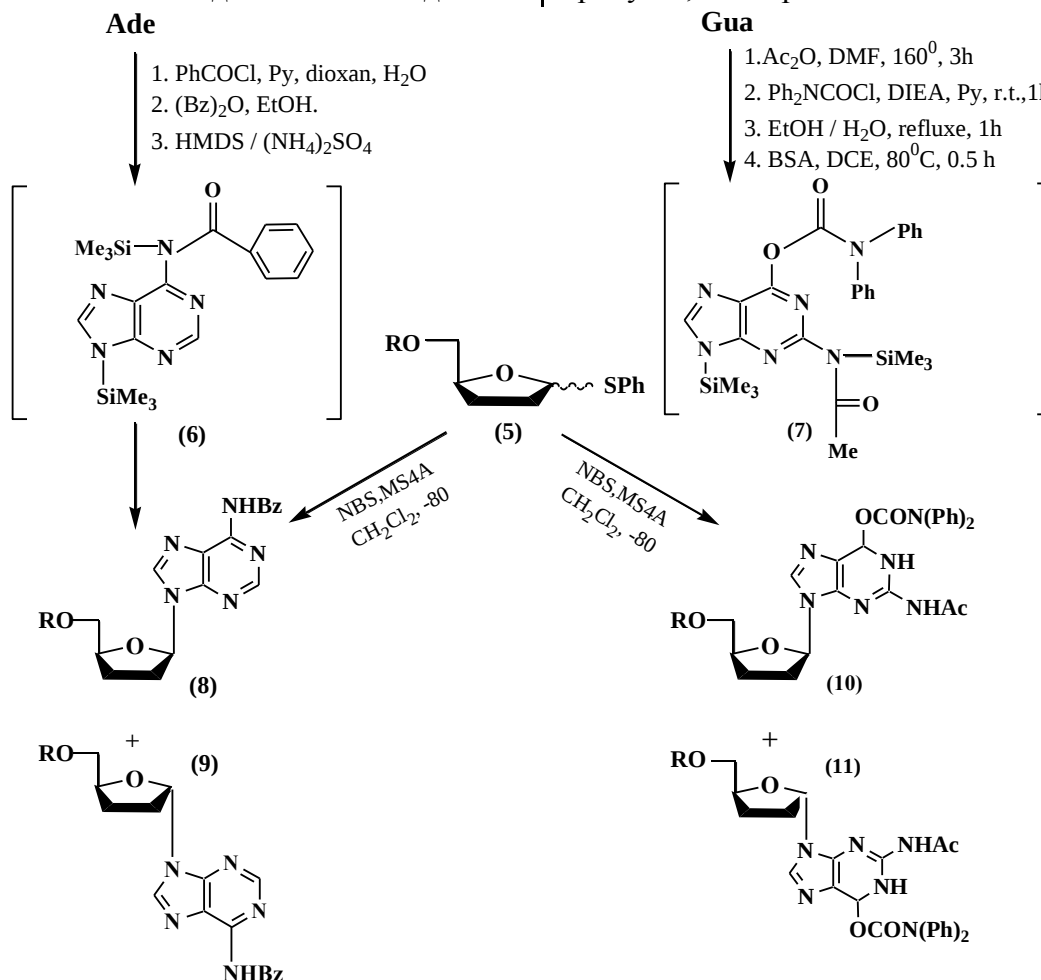


Схема 1.

ЭКПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

2-N-бензоил-9-(5'-О-трет-бутилдифенилсилил-2',3'-дидезокси-β-D-пентофуранозил)-аденин (8), 2-N-бензоил-9-(5'-О-трет-бутилдифенилсилил-2',3'-дидезокси-α-D-пентофуранозил)-аденин (9).

А. 2-N-Bz-аденин 0.11 г (0.45 ммоль) кипятили с обратным холодильником в (7 мл) гексаметилдисилазана, в присутствии небольшого количества сульфата аммония ~ 2 ч., в атмосфере инертного газа до образования прозрачного раствора. Затем удаляли остатки HMDS. К раствору силилированного 2-N-Bz-аденина 6 в хлористом метиле добавляли тиогликозид 5 0.1 г (0.22 ммоль) в атмосфере инертного газа, в присутствии MS 4A и при охлаждении до -80⁰C, а затем NBS 0.087 г (0.49 ммоль) растворенный в небольшом количестве растворителя. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении 5 часов. Затем добавляли водный раствор тиосульфата натрия и нагревали реакционную массу до комнатной температуры. Экстрагировали хлористым метилом, сушили безводным сульфатом натрия. Удаляли растворитель, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя системой гексан-этилацета 3:7. Получали смесь аномеров α / β. Выход 0,057 мг. (45 %). ^1H -ЯМР спектр, (CDCl₃), δ, м.д.:

α -аномер: $R_f=0.33$. ^1H -ЯМР спектр, (CDCl_3), δ , м.д.: 9.05 (NH, s, 4-NH); 8.78 (1H, s, 2-H); 8.32 (1H, s, 8-H); 8.10 (1H, s, 8-H); 7.98-7.3 (15H, m, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Si}$ -, $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{C}(\text{O})$ -); 6.38 (1H, m, 1'-CH); 4.56 (1H, m, 4'-CH); 4.28 (1H, m, 4'-CH); 3.95 (1H, dd, $J=6.02$, $J=6.01$, $J=11.2$, 5'-CH₂); 3.70 (1H, dd, $J=7.01$, $J=7.01$, $J=12.0$, 5'-CH₂); 2.19 (2.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.78 (1.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.00 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -).

β -аномер: $R_f=0.41$. ^1H -ЯМР спектр, (CDCl_3), δ , м.д.: 9.06 (NH, s, 4-NH); 8.80 (1H, s, 2-H); 8.34 (1H, s, 8-H); 8.12 (1H, s, 8-H); 8.0-7.3 (15H, m, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Si}$ -, $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{C}(\text{O})$ -); 6.38 (1H, m, 1'-CH); 4.59 (1H, m, 4'-CH); 4.29 (1H, m, 4'-CH); 3.95 (1H, dd, $J=6.02$, $J=6.01$, $J=11.2$, 5'-CH₂); 3.71 (1H, dd, $J=7.01$, $J=7.01$, $J=12.0$, 5'-CH₂); 2.19 (2.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.78 (1.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.00 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -).

2-N-ацетил-9-(5'-О-трет-бутилдифенилсилил-2',3'-дидезокси- β -D-пентофуранозил)-6-О-(дифенилкарбамоил)гуанин (10), 2-N-ацетил-9-(5'-О-трет-бутилдифенилсилил-2',3'-дидезокси- α -D-пентофуранозил)-6-О-(дифенилкарбамоил)гуанин (11).

BSA (0,3 мл.) добавляли к суспензии 2-N-ацетил -6-О-(дифенилкарбамоил)гуанина 0,104 г. (0,267 ммоль) в сухом дихлорэтано (3 мл.), и перемешивали при 80 °С, в атмосфере инертного газа до образования прозрачного раствора. Затем удаляли остатки силилирующего агента. К раствору силилированного 2-N-ацетил -6-О-(дифенилкарбамоил)гуанина 7 в хлористом метиле добавляли тиогликозид 5 0,08 г (0,179 ммоль) в атмосфере инертного газа, в присутствии MS 4A и при охлаждении до -80 °С, а затем NBS 0,035 г (0,197 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при охлаждении 2 часа. Затем добавляли водный раствор тиосульфата натрия и нагревали реакционную массу до комнатной температуры. Экстрагировали хлористым метилом, сушили безводным сульфатом натрия. Удаляли растворитель, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя системой гексан-этилацетат 7:3. Получали смесь аномеров α/β . Выход 0.038 г (29 %).

α -аномер: $R_f=0.37$. ^1H -ЯМР спектр, (CDCl_3), δ , м.д.: 8.21 (1H, s, 2-H); 8.19 (1H, s, -NH-); 7.71-7.3 (20H, m, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Si}$ -, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{N}$ -); 6.2 (1H, m, 1'-CH); 4.25 (1H, m, 4'-CH); 3.90 (1H, dd, $J=6.02$, $J=6.01$, $J=11.2$, 5'-CH₂); 3.70 (1H, dd, $J=7.01$, $J=7.01$, $J=12.0$, 5'-CH₂); 2.5 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$ -), 2.05 (2.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.62 (1.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.00 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -).

β -аномер: $R_f=0.58$. ^1H -ЯМР спектр, (CDCl_3), δ , м.д.: 8.00 (1H, s, 2-H); 7.90 (1H, s, -NH-); 7.65-7.3 (20H, m, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Si}$ -, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{N}$ -); 6.2 (1H, m, 1'-CH); 4.5 (1H, m, 4'-CH); 3.90 (1H, dd, $J=6.02$, $J=6.01$, $J=11.2$, 5'-CH₂); 3.70 (1H, dd, $J=7.01$, $J=7.01$, $J=12.0$, 5'-CH₂); 2.5 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$ -) 2.05 (2.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.62 (1.5H, m, 2'-CH₂, 3'-CH₂); 1.00 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Erik De Clerc, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1587, 258-275 (2002)
2. H. Vorbrüggen and B. Bennua, *J. Chem. Ber.*, 114, 1279-1286 (1981)
3. K.Sujino and H.Sujimura, *Synlett*, 553-555 (1992)
4. H.Sujimura, K.Osumi and K.Sujino, *J. Org. Chem.*, 59 (25), 7653-7660 (1994)
5. Г.Д.Гунгарова, А.И.Давыдова, А.С.Архипова, Е.Н.Савватеева, Ю.Г. Кириллова А.И.Люттик, А.М.Юркевич, В.И.Швец, *Химфарм* (в печати)
6. L.Horner and H.Neumann, *J. Chem. Ber.*, 98, 3462 (1965)
7. H.Sugimura, K. Osumi and K.Sujino, *J. Org. Chem.*, 59 (25), 7653-7660 (1994)
8. P.Garner and S.Ramakanth, *J. Org. Chem.*, 53, 1294-1298 (1988)
9. Z.Ruiming and M.J.Robins, *Can. J. Chem.*, 65, 1436-1437 (1987)
10. Савватеева Е.Н., Магистерская диссертация «Исследование путей синтеза 2,3-дидезокси-3-фторгуанозина.», М 2003, 65-66.

Е.С.Калинина
аспирант,
Н.В.Позднякова*
научный сотрудник,
Д.А.Корженевский*
научный сотрудник,
Н.Б.Фельдман*
научный сотрудник,
С.В.Луценко*
зав. лабораторией,
В.И. Швец
академик РАМН
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова
*Московский НИИ медицинской экологии

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭНДОСТАТИНА

УДК 575.116.12

Разработана оригинальная методика выделения рекомбинантного эндостатина человека из культуры клеток штамма-продуцента *E. coli*. Получена липосомная форма эндостатина и исследована ее цитотоксическая активность *in vitro* и противоопухолевая активность *in vivo*

Введение

Более четверти века назад было постулировано, что рост раковых образований возможен только при условии возникновения в самой опухоли сети кровеносных сосудов [1]. На основе этого предположения возникло направление борьбы со злокачественным ростом, основанное на применении препаратов, способных специфически подавлять ангиогенез опухоли, и, как следствие, ее рост. Поиск таких антиангиогенных веществ привел к открытию в 1994 году первого эндогенного ингибитора ангиогенеза, названного ангиостатином [2]. Вскоре были выделены эндостатин [3], фрагменты 1 и 2 протромбина [4], расщепленный антитромбин III [5], фрагменты фибрина/фибриногена [6] и многие другие фрагменты физиологических полипептидов, также способные ингибировать ангиогенез.

Эндостатин, впервые выделенный из супернатанта клеточной линии гемангиоэндотелиомы мышей, представляет собой С-концевой фрагмент

коллагена XVIII с молекулярной массой 20 kDa.. Эндостатин был клонирован и экспрессирован как в прокариотической системе *E. coli*, так и в эукариотической дрожжевой системе [3, 7]. Исследования на животных показали, что рекомбинантный эндостатин способен подавлять рост различных мышечных и трансплантированных мышам человеческих опухолей [8,9]. Однако получение рекомбинантного эндостатина в растворимой форме, пригодной для использования в клинической практике, представляет собой трудно разрешимую проблему. Целью настоящей работы являлась разработка протокола выделения растворимой формы эндостатина из биомассы продуцента *Escherichia coli*, а также получение липосомной формы данного белка и исследование ее биологической активности.

Материалы и методы

Получение телец включения из биомассы штамма-продуцента *E. coli*. Осадок клеток продуцента был получен центрифугированием культуры при 2500 g и 4°C в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в буфере для обработки ультразвуком [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0], затем прибавляли лизоцим до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Суспензию подвергали обработке

ультразвуком в присутствии 0,1% натрия деоксихолата, затем центрифугировали при 10 g в течение 10 мин. Процедуру обработки препарата ультразвуком повторяли еще дважды. Полученные в результате тельца включения хранились при -20°C и использовались для дальнейших манипуляций.

Солюбилизация телец включения и ренатурация эндостатина. Осадок телец включения растворяли в буфере [0,1 М Tris -HCl, pH 8.0, 6 М мочевины] и инкубировали 30 мин при 4°C, после чего центрифугировали при 13 400 g и 7°C в течение 15 мин. Супернатант разводили в буфере [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0, 6 М мочевины, 1% D-маннитол] до концентрации эндостатина около 0,02 мг/мл и диализовали против 200 объемов буфера [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0, 1 М мочевины, 1% D-маннитол, 1 mM GSSG, 5 mM GSH] в течение суток. Центрифугировали диализат при 13 400 g и 7°C в течение 15 мин. Супернатант диализовали против 200 объемов буфера [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0] в течение суток. Центрифугировали диализат при 13 400 g и 7°C в течение 15 мин. Супернатант анализировали при помощи SDS-PAGE с использованием стандартного протокола [10]. Определение содержания свободных SH- групп проводили по методу Элмана с использованием стандартного протокола [10].

Получение липосомной формы эндостатина осуществляли с использованием стандартного протокола [11].

Исследование цитотоксической активности (ЦТА) эндостатина in vitro проводили, определяя выживаемость клеток после их инкубации с исследуемым препаратом в течение 72 ч с помощью МТТ-теста по методике [12].

Исследование противоопухолевой активности эндостатина и его липосомной формы проводили на мышах линии C57BL/6 с привитыми опухолями мышинной меланомы В16. Опухолевые клетки трансплантировали подкожно в область спины животных (2×10^5 клеток в 0,1 мл физиологического раствора). Препараты эндостатина вводили животным начиная с 10-го дня после прививки опухоли. Терапию осуществляли в течение двух

недель, вводя препараты через день в дозе 90 мг/кг веса животного. Размер солидных опухолей измеряли один раз в 2-3 дня. Объем опухоли вычисляли по формуле

$$V = a^2 \cdot b \cdot \frac{\pi}{6}, \text{ где } a - \text{короткий, } b - \text{длинный}$$

диаметр опухоли. Торможение роста опухолей (ТРО) определяли по формуле:

$$TPO = \left(1 - \frac{P_{on}}{P_k}\right) \cdot 100\%, \text{ где } P_{on} - \text{средний}$$

размер опухолей в опытной группе, P_k – средний размер опухолей у контрольных животных. Увеличение средней продолжительности жизни (УСПЖ) леченых животных относительно контрольных определяли по формуле:

$$УСПЖ = \left(\frac{T}{C} - 1\right) \cdot 100\%, \text{ где } T - \text{средняя}$$

продолжительность жизни (СПЖ) леченых животных, дни, C – СПЖ контрольных животных, дни.

Результаты и их обсуждение

Согласно протоколу, представленному в данной работе, выход растворимого рекомбинантного эндостатина составил около 15 мг из 1 л культуры. Конечный диализат не содержал видимых частиц и стабильно хранился при 4°C, не меняя своих свойств после замораживания при -20°C или лиофильного высушивания. Преципитат агрегированного белка не образовывался при удалении редокс-пары глутатиона в ходе эксперимента, что также говорит о стабильности полученного препарата эндостатина. Препарат проверяли на наличие высокомолекулярных агрегатов с помощью сравнительного SDS-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (в присутствии и без β-меркаптоэтанола) (рис. 1). Генетическая конструкция, использованная в данной работе, позволяет достичь высокого уровня экспрессии эндостатина. Однако, как и многие другие рекомбинантные белки, эндостатин в прокариотической системе *E. coli* синтезируется в виде агрегатов, которые формируют тельца включения. Правильно свернутый эндостатин имеет компактную глобулярную структуру, стабилизированную двумя дисульфидными связями [13].

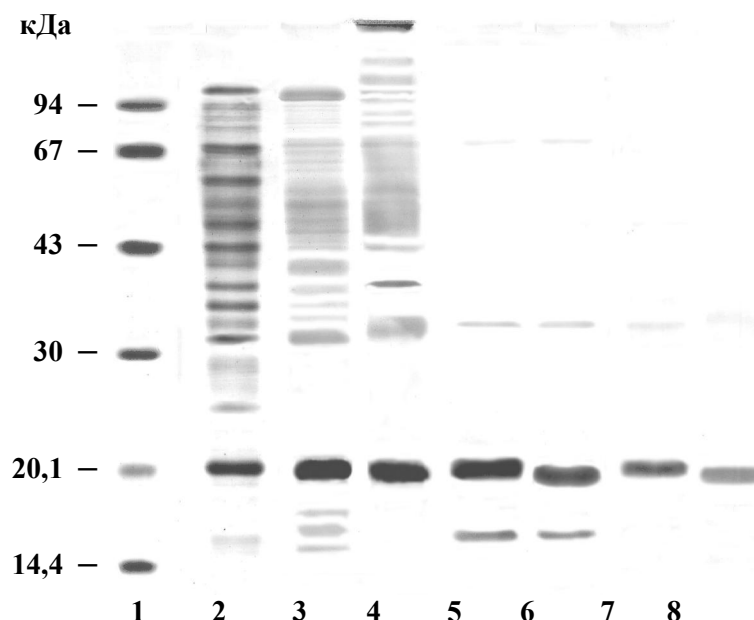


Рис. 1. Электрофорез препаратов эндостатина на различных стадиях выделения. 1 – стандарты молекулярной массы; 2 – биомасса штамма-продуцента; 3, 4 – препарат телец включения; 5, 6 – препарат эндостатина после стадии ренатурации; 7, 8 – конечный препарат эндостатина. Дорожки 2, 3, 5, 7 – в присутствии β -меркаптоэтанола; 4, 6, 8 – в отсутствии β -меркаптоэтанола

Анализ по методу Элмана показал, что в тельцах включения после их солюбилизации содержится 98% свободных SH-групп, в то время как свободные SH-группы в конечном диализате практически отсутствуют. Эти результаты, а также стабильность полученного раствора эндостатина, позволяют сделать вывод о правильной ренатурации белка в условиях используемого протокола. Чистота полученного препарата эндостатина составляла $> 98\%$ по данным электрофореза (рис. 1, дорожка 8). Стабильность препарата позволяет использовать его для дальнейших лабораторных исследований, а также дает

возможность получения препарата растворимого эндостатина в больших количествах.

Исследование специфической биологической активности эндостатина *in vitro* проводили на культурах эндотелиальных клеток аорты быка АВАЕ, эндотелиальных клеток лимфатических сосудов мыши SVEC4-10, а также на первичной культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Результаты исследования приведены на рис. 2. Как видно на рис. 2, эндостатин оказывал дозозависимое цитотоксическое действие на все три типа исследованных эндотелиальных клеток.

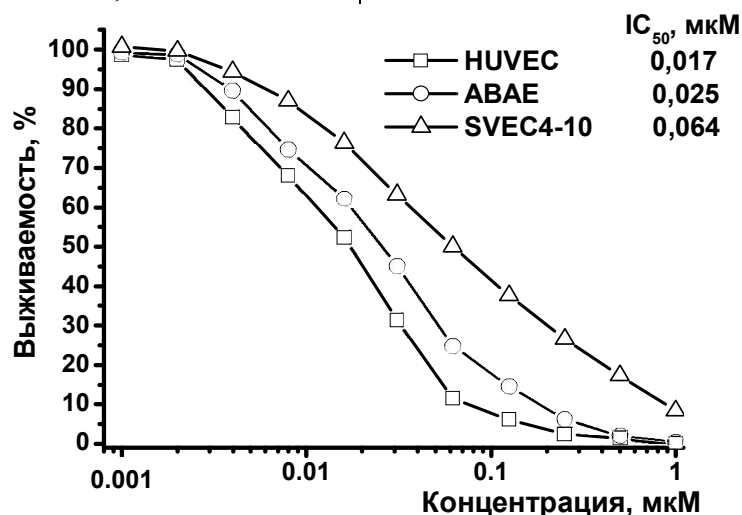


Рис. 2. ЦТЭ эндостатина в отношении эндотелиальных клеток линий HUVEC, АВАЕ и SVEC4-10.

При этом наибольший цитотоксический эффект достигался в отношении линии эндотелиоцитов пупочной вены человека HUVEC ($IC_{50} = 0,017$ мкМ). Очень близкую ЦТА эндостатин проявлял в отношении клеточной линии АВАЕ ($IC_{50} = 0,025$ мкМ). Таким образом, полученный белок проявляет выраженную антиангиогенную активность в отношении различных линий эндотелиальных клеток, что характеризует его в качестве эффективного антиангиогенного агента.

Для получения липосомной формы эндостатина применяли метод экструзии. Липосомы получали ультразвуковой обработкой дисперсии оволецитин-холестерин-белок с последующим многократным продавливанием через ядерный поликарбонатный фильтр. Размер полученных липосом был строго фиксированным и составлял 100 нм. Поскольку капилляры, образовавшиеся в результате опухолевого неоангиогенеза, характеризуются наличием в слое эндотелия большого количества пор размером до 800 нм, липосомы при циркуляции в кровотоке будут проникать преимущественно в солидные опухоли [14], обеспечивая направленный транспорт антиангиогенного препарата. Липосомный и гомогенный эндостатин вводили парентерально мышам с опухолями меланомы В16 один раз в неделю, при том, что курсовая противоопухолевая терапия эндостатином в обоих случаях

предполагает значительно более частые инъекции препаратов: каждые 12 или 24 часа в течение ряда недель [15,16]. Однако применение липосомных форм полипептидных препаратов позволяет значительно увеличить время их полужизни в организме и повысить терапевтическую эффективность. В нашем исследовании это подтверждается значительно большим ТРО у мышей, получавших липосомную форму эндостатина (68,6%, данные на 35 день после прививки опухоли) по сравнению с мышами, которым вводили водный раствор белка (41,0%). Терапия липосомной формой эндостатина также приводила к двукратному УСПЖ по сравнению с терапией нелипосомным препаратом (24,6% vs. 47,3%).

Исследование противоопухолевого эффекта липосомного эндостатина при его комбинированном применении с доксорубицином показало, что введение препарата в режиме сочетанной терапии с доксорубицином приводило к значительному подавлению роста опухолей (на 72,6%) и увеличению продолжительности жизни животных на 55,2%. При этом значения ТРО и УСПЖ превышали таковые от монотерапии липосомным эндостатином. Таким образом, введение в терапевтическую схему доксорубицина позволяет существенно повысить эффективность терапии липосомным эндостатином.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971, 285, 1182-1186.
2. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y. et al. *Cell* 1994, 79, 315-328.
3. O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y. et al. *Cell* 1997, 88, 277-285.
4. Rhim T.Y., Park C.S., Kim E., Kim S.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 252, 513-516.
5. O'Reilly M.S., Pirie-Shepherd S., Lane W.S., Folkman J. *Science* 1999, 285, 1926-1928.
6. Broun N.J., Staton C.A., Rodgers G.R. et al. *Br. J. Cancer* 2002, 86, 1813-1816.
7. Dhanabal M., Ramchandran R., Volk R. et al. *Cancer Res.* 1999, 59, 189-197.
8. Sim B.K.L. *Angiogenesis* 1998, 2, 37-48.
9. Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M.S. *Nature (Lond.)* 1997, 390, 404-407.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., and Manniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
11. MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991, 1061(2), 297-303.
12. Mosmann T. *J. Immunol. Meth.* 1983, 65 (1-2), 55-63.
13. Hohenester E., Sasaki T., Olsen B.R. and Timpl R. *EMBO J.* 1998, 17, 1656-1664.
14. Allen T.M., Cullis P.R. *Science* 2004, 303, 1818-1822.
15. Scappaticci F. A. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20, 3906.
16. Cao Y., Xue L. *Semin. Thromb. Hemostas.* 2004, 30(1), 83.

А.В. Лаптев
аспирант,
А.Ю. Лукин
ассистент,
А.А. Ходонов
профессор,
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СИНТЕЗ АНАЛОГОВ РЕТИНАЛЯ РЯДА СПИРОПИРАНОВ, ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БАКТЕРИООПСИНОМ ИЗ *H. salinarum*

УДК 547.381.057

Показана возможность создания аналогов ретиналя, у которых триметилциклогексеновое кольцо молекулы ретиналя замещено на спиропирановый фрагмент. Исследован процесс взаимодействия синтезированных аналогов ретиналя с бактериоопсином в составе апомембран *Halobacterium salinarum* и их спектральные свойства образующихся пигментов.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время особый интерес представляет исследование реализации возможности обратимого фотоуправления определенными биологическими процессами (например, биокатализом или процессами распознавания в системах лиганд-рецептор), что может быть использовано для разработки нового поколения нанобиоустройств, осуществляющих трансформацию оптического сигнала в определенный тип биохимического ответа.

На сегодняшний день известно достаточно большое число классов фотохромных соединений: диазобензолы,

спиропираны и спиронафтоксазины, хромены, фульгиды, бисгетероарилэтены, а также ряд представителей биофотохромов: фитохром, бактериородопсин, фотоактивный желтый белок и др. Множество современных публикаций касаются, в том числе, применений фотохромов в различных областях человеческой деятельности [1-8].

В качестве целевой биологической мишени нами была выбрана уникальная светозависимая протонная транслоказа – бактериородопсин из галофильной бактерии *Halobacterium salinarum*.

Задача настоящей работы состояла в создании путей синтеза и исследований свойств нового гибридного аналога ретиналя, объединившего в своей молекуле остаток спиропиранового ядра и полиеновый фрагмент природного ретиналя, а также процесса его взаимодействия с бактериоопсином в составе апомембран *Halobacterium salinarum* и спектральные свойства образующихся пигментов (рис 1).

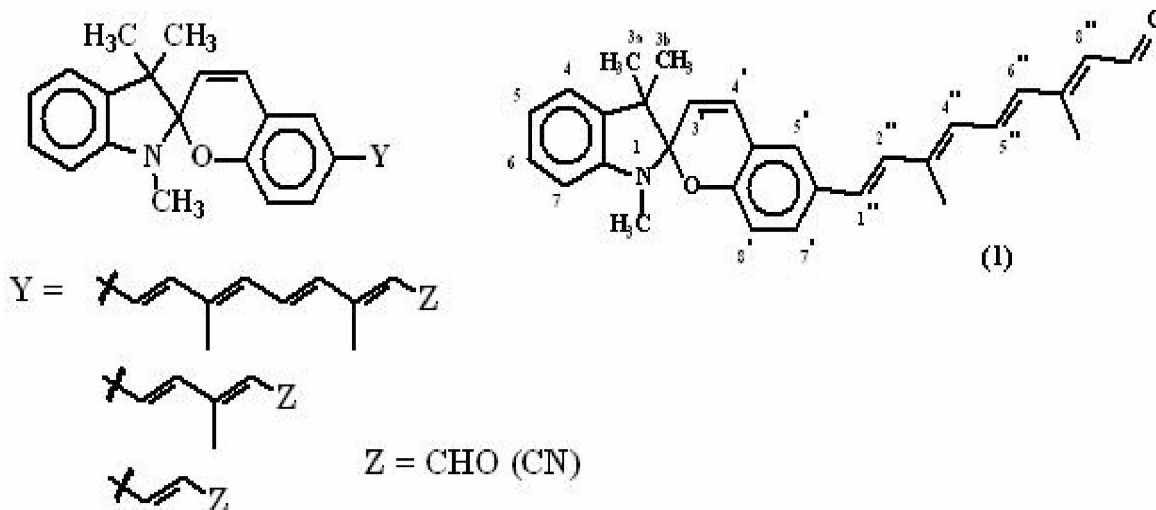


Рис. 1. Структуры целевых аналогов ретиналя и порядок нумерации атомов целевого соединения (1).

Бактериородопсин – хорошо изученный мембранный белок, для изучения механизма его работы применяют несколько основных методов: замена природного хромофора *all-E*-ретиная на аналог, замещение одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы белка методами сайт-специфического мутагенеза, использование химических добавок или физических воздействий различного рода. На предварительном этапе работы нами с помощью программы HyperChem v.7.1 (HyperCube, США) было проведено моделирование хромофорной области бактериородопсина. Полученная топография центра связывания хромофора, результаты ранних работ нашей кафедры и анализ известных данных о стерических ограничениях белковой части молекулы позволили сделать выбор серии целевых структур аналогов ретиная, показанных на рис. 1 [10-16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале работы был осуществлен синтез предшественников спиропиранов –

производных 2-гидроксibenзальдегида (салициловый альдегид) (2). Был осуществлен синтез интермедиата (3), содержащего хлорметильную группу, которую затем трансформировали в формильную в условиях реакции Соммле с выходом 75%. Синтез производных салицилового альдегида производился по известным методикам [17].

Следующим этапом работы предстояло исследовать реакцию конденсации производных салицилового альдегида с 1,3,3-триметил-2-метилениндоленином (индоленин или основание Фишера) (5) (схема 1).

Реакция конденсации простейших производных салицилового альдегида с основанием Фишера (5) достаточно хорошо исследована в литературе [9,18-21]. Так же в нашей лаборатории было проведено ряд работ по воспроизведению и оптимизации известных методик, чтобы затем использовать их для циклизации с полученными нами ранее производными салицилового альдегида.

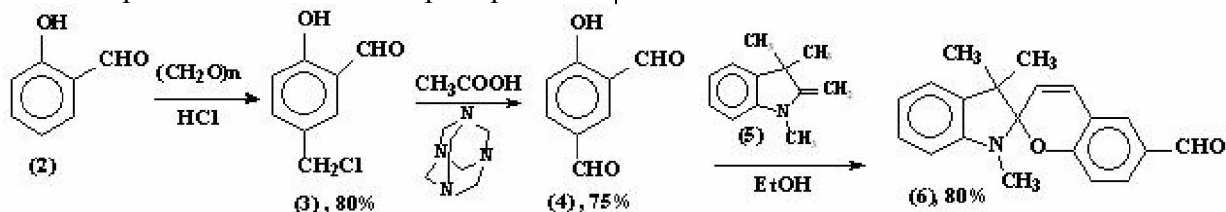


Схема 1. Синтез формильного спиропирана (6).

В качестве основной стратегии синтеза работы был выбран путь изображенный на схеме 2.

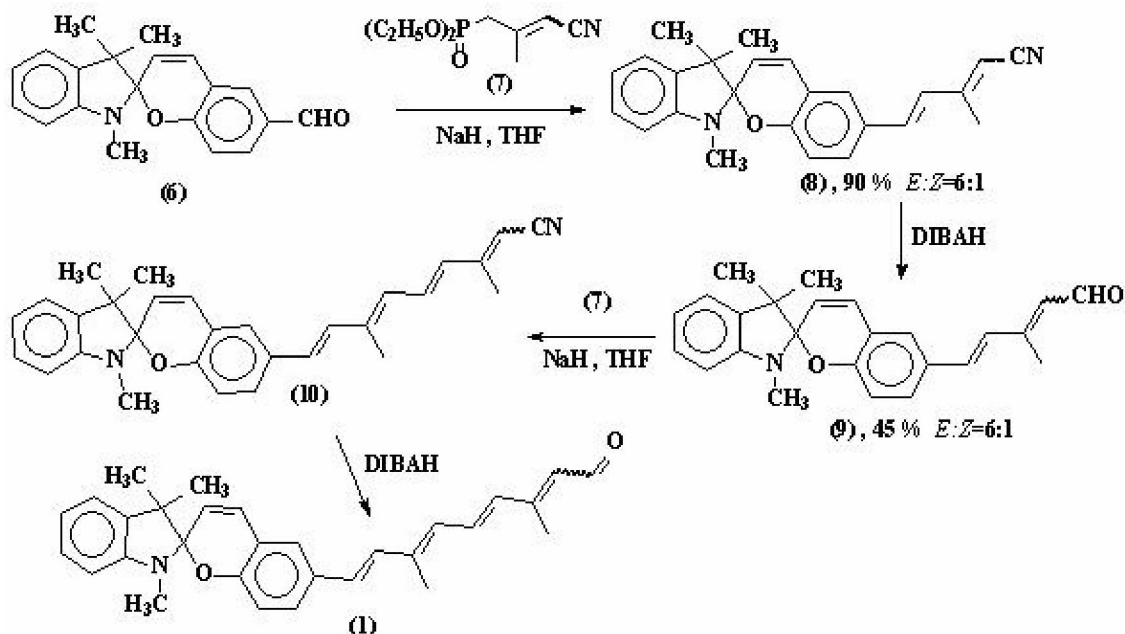


Схема 2. Синтез целевого соединения (1).

Дополнительно нами получены винилоги спиропиранов (схема 3).

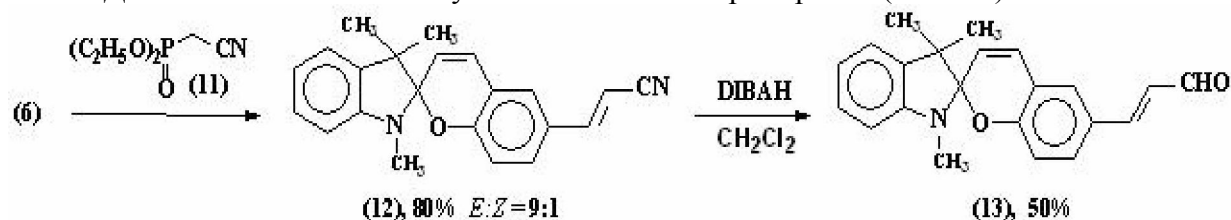


Схема 3. Получение спиропиранов (12) и (13).

В качестве исходного формильного производного для наращивания полиеновой цепи был выбран 1,3,3-триметил-6'-формилиндолин-2-спиро-2'-2H-хромен (6). Олефинирование проводили C_2 - и C_5 -фосфонатами, C_5 -фосфонат (7) применялся в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров с соотношением 60:40 по данным 1H -ЯМР. Для генерации аниона фосфоната были использованы следующие условия $NaH/THF/0^\circ C$ и соотношение реагентов: альдегидный компонент / фосфонат / гидрид 1:1.2:1.5. В результате реакции был получен соответствующий нитрил (8) с выходом 90% в виде смеси 3''*E*- и 3''*Z*-изомеров 6:1, вновь образующаяся связь имела 1''*E*-конфигурацию с J 16.3 Гц. Соединение (12) было получено олефинированием C_2 -фосфонатом (11), конфигурация вновь образующейся связи была преимущественно *E*, реакционная масса содержала не более 10% *Z*-изомера продукта.

Для трансформации нитрильной группы в формильную была использована стандартная процедура ее восстановления с помощью диизобутилалюмогидрида (DIBAL) при $-90^\circ C$. Значительное охлаждение реакционной смеси производилось с целью избежания побочной реакции восстановления двойной 3'-4' связи пиранового цикла. В результате был получен целевой полиеналь (9) и соединение (13) с выходом 45% в виде смеси 3''*E*- и 3''*Z*-изомеров 6:1 для (9).

Далее планируется осуществить повторную процедуру олефинирования C_5 -фосфонатом (7) и восстановление DIBAL для (10). Таким образом, нами показана принципиальная возможность применимости предложенной схемы синтеза для получения гибридных фотохромных соединений, сочетающих в одной молекуле спиропирановый и полиеновый фрагменты, целевые и промежуточные соединений

получены в препаративных количествах и охарактеризованы физико-химическими методами анализа.

Новые спиропирановые соединения, содержащие сопряженные кратные связи в 6'-положении спиропирана полученные нами были исследованы в Центре Фотохимии Российской академии наук.

Были исследованы винилоги спиропиранов, и наличие фотохромного поведения установлено. Следует отметить, что в условиях нашего опыта время жизни окрашенных форм было крайне мало относительно спиропиранов, содержащих сильные акцепторные заместители в пирановой части молекулы.

Дальнейшие исследования включали изучения взаимодействия полученных соединений с биологическими объектами. При спектрофотометрическом контроле взаимодействия аналогов ретиналя с бактериоопсином в составе апомембран *H. salinarum* было установлено, что образование ковалентного комплекса возможно для аналога (9) с максимумом поглощения 440 нм (рис. 2).

Для полиеналей с более короткой полиеновой цепью, например (13) не возможно образование ковалентного комплекса, как и для аналогов с нитрильными терминальными группами, неспособных к образованию альдиминной связи (рис. 2). Подобное явление ранее наблюдалось так же и для других ароматических аналогов ретиналя с укороченной полиеновой цепью.

Таким образом, на примере (9) минимальное количество сопряженных кратных связей (длина цепи) должно быть не менее 2, в противном случае образование ковалентного комплекса из бактериоопсина и аналога ретиналя становится невозможным.

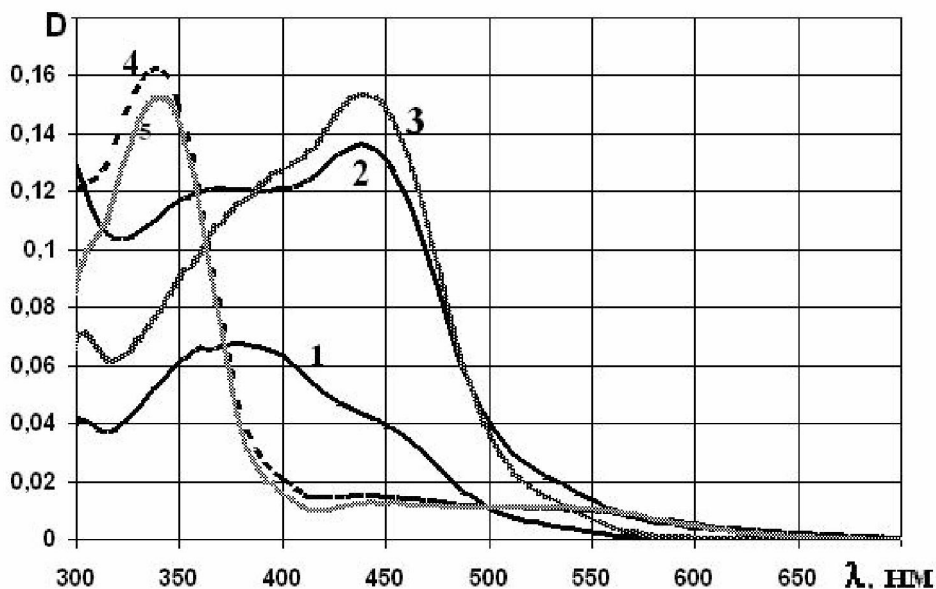


Рис. 2. Спектрофотометрический контроль образования комплекса из производных спиропиранов и апомембран из *H. salinarum*. Концентрация белка 1.9 мг/мл, 25 °С, pH 6.0, 5 mM MES.

1-3 - альдегид (9): 1 – 1 мин, 2 – 50 мин, 3 – 3 сут; 4-5 - альдегид (13): 4 – 1 мин, 5 – 3 сут.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандартная методика конденсации производных салицилового альдегида со свежеперегранным индолеином (5).

1,3,3-Триметил-6'-формилиндолин-2-спиро-2'-2Н-хромен (6)

В 250 мл колбу, снабженную обратным водяным холодильником с хлоркальциевой трубкой, поместили 3.0 г (19.98 ммоль) 5-формилсалицилового альдегида (4) и 60 мл этанола. В атмосфере аргона пипеткой добавили 3.2 мл (18.32 ммоль) свежеперегрannого индолеина (5). Колбу закрыли от воздействия света алюминиевой фольгой. Реакционный раствор нагревали при кипении в течение 2.5 ч. Затем реакционную смесь оставили при комнатной температуре на 12 ч.

Выпавший осадок отфильтровали, промыли на фильтре этанолом. Маточный раствор хроматографировали на силикагеле хлористым метиленом.

Суммарный выход 4.4 г (14.40 ммоль) (80.0 %), белые кристаллы т.пл. 127÷128°C (лит. данные т.пл. 129÷130°C [19,21]). R_f 0.73 (система А - хлористый метилен : петролейный эфир 3:2; детекция пятен – воздействием на проявленную пластинку естественного света или 2,4-динитрофенилгидразином).

^1H -ЯМР-спектр [(CDCl_3) , δ , м.д]: 1.18 (3H, с, 3a – CH_3), 1.29 (3H, с, 3b – CH_3), 2.74 (3H, с, 1 – CH_3), 5.79 (1H, д, J 10.2, 3' – H), 6.54 (1H, д, J 7.7, 7 – H), 6.82 (1H, д, J 8.5, 8' – H), 6.87 (1H, тд, J 7.3/0.85, 5 – H), 6.92 (1H, д, J 10.2, 4' – H), 7.08 (1H, дд, J 7.3/0.85, 4 – H), 7.19 (1H, тд, J 7.7/1.28, 6 – H), 7.61 (1H, с, 5' – H), 7.63 (1H, дд, J 8.5/2.13, 7' – H), 9.83 (1H, с, 6' – CHO).

Масс-спектр [m/z , $I_{\text{отн}}$]: 305 (M^+ , 90).

Исследование олефинирования карбонильных соединений в условиях реакции Хорнера-Эммонса для производных спиропиранов

Смесь (1E,3Z) и all-E-изомеров 6'-(3-метил-4-цианобута-1,3-диенил)-1,3,3-триметилиндолин-2-спиро-2'-2Н-хромена (8)

В 3-х горлыш реактор объемом 100 мл в атмосфере аргона загружали 240 мг (6.0 ммоль) 60% суспензии гидрида натрия в минеральном масле и 5 мл абсолютного THF.

После охлаждения на ледяной бане до 0 °С и при интенсивном перемешивании к смеси по каплям прибавляли при помощи шприца 0.7 мл (3.61 ммоль) C_5 -фосфоната (7) и оставили при перемешивании на 1 ч до полного растворения гидрида натрия. Затем при перемешивании по каплям добавили раствор 1.0 г (3.28 ммоль) 1,3,3-триметил-6'-формилиндолин-2-спиро-2'-2Н-хромена (6) в 5 мл THF. Еще через 1 ч перемешивания к смеси добавили 8 мл дистиллированной воды (рН смеси 10), довели значение рН до 6 при помощи 0,1 М соляной кислоты. Экстрагировали хлористым метиленом в делительной воронке тремя порциями по 30 мл. Экстракты объединяли и сушили над безводным

сульфатом натрия, растворитель удаляли. Для выделения целевого продукта применяли колоночную хроматографию на окиси алюминия. Фракции, содержащие целевое соединение объединяли, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме 1 ч при 0.2 мм рт. ст.

Выход: 1.1 г (2.99 ммоль) (92 %). R_f 0.70 для (1*E*,3*Z*) и 0.74 *all-E*-изомера (система А; детекция пятен – воздействием на проявленную пластинку видимого света или паров йода). Соотношение изомеров (1*E*,3*Z*) : *all-E*- 1 : 6 (по данным ^1H -ЯМР-спектров).

УФ-спектр [(MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм, (log ϵ): 230 (4.39); 245 (4.37); 285 пл. (4.44); 278 (4.44); 340 (4.55); 347 пл. (4.55).

^1H -ЯМР-спектр [(CDCl₃), δ , м.д]:

all-E-изомер: 1.17 (3H, с, 3a – CH₃), 1.30 (3H, с, 3b – CH₃), 2.25 (3H, с, 3'' – CH₃), 2.73 (3H, с, 1 – CH₃), 5.29 (1H, д, J 7.9, 4'' – H), 5.74 (1H, д, J 10.4, 3' – H), 6.52 (1H, д, J 7.3, 7 – H), 6.68 (1H, д, J 15.9, 2'' – H), 6.70 (1H, д, J 8.6, 8' – H), 6.81 (1H, д, J 15.9, 1'' – H), 6.84 (1H, т, J 7.3, 5 – H), 6.85 (1H, д, J 10.4, 4' – H), 7.07 (1H, д, J 7.7, 4 – H), 7.17 (1H, с, 5' – H), 7.18 (1H, т, J 7.3, 6 – H), 7.22 (1H, дд, J 8.6/1.8, 7' – H).

(1*E*,3*Z*)-изомер: 2.16 (3H, с, 3'' – H).

Масс-спектр [m/z , $I_{\text{отн}}$]: 368 (M^+ , 46).

(*E*)-1,3,3-Триметил-6'-(2-циано-1-этенил)индолин-2-спиро-2'-2*H*-хромен (12)

Соединение (12) было получено аналогично (8) из 1 г (3.28 ммоль) 1,3,3-триметил-6'-формилиндолин-2-спиро-2'-2*H*-хромена (6) и аниона, генерированного действием 23 мг (0.65 ммоль) 60% суспензии гидрида натрия в минеральном масле на 0.6 мл (3.4 ммоль) C₂-фосфоната (11). Для выделения целевого продукта применяли колоночную хроматографию на окиси алюминия.

Выход: 0.9 г (2.70 ммоль) (83,3 %). R_f 0.76 (система А; детекция пятен – воздействием на проявленную пластинку видимого света или паров йода).

УФ-спектр [(MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм, (log ϵ): 247 пл. (4.46); 265 (4.57); 320 (4.40).

^1H -ЯМР-спектр [(CDCl₃), δ , м.д]: 1.27 (3H, с, 3a – CH₃), 1.28 (3H, с, 3b – CH₃), 2.72 (3H, с, 1 – CH₃), 5.67 (1H, д, J 16.6, 2'' – H), 5.77 (1H, д, J 10.2, 3' – H), 6.53 (1H, д, J 7.9, 7 – H), 6.72 (1H, д, J 8.4, 8' – H), 6.85 (1H, д, J 10.2, 4' – H), 6.86 (1H, тд, J 7.5/1.0, 5 – H), 7.07 (1H, дд, J 7.3/0.8, 4 – H), 7.14 (1H, д, J 2.2, 5' – H), 7.18 (1H, тд, J 7.7/1.4, 6 – H), 7.21 (1H, дд, J 8.6/2.2, 7' – H), 7.28 (1H, д, J 16.6, 1''-H).

Масс-спектр [m/z , $I_{\text{отн}}$]: 328 (M^+ , 24).

Исследование восстановления терминальной нитрильной группы при помощи DIBAH

Смесь (1*E*,3*Z*) и *all-E*-изомеров 6'-(3-метил-4-формилбута-1,3-диенил)-1,3,3-триметилиндолин-2-спиро-2'-2*H*-хромена (9)

В 3-х горлыш "сухой" реактор объемом 100 мл в атмосфере аргона загружали при перемешивании на магнитной мешалке 250 мг (0.68 ммоль) соединения (8) в 3 мл свежеперегнанного хлористого метилена. Погружали реактор в ацетоновую баню и охлаждали ее до -100 °С при помощи жидкого азота. Добавляли в реактор при перемешивании по каплям при помощи шприца 0.60 мл 1.5 М раствора DIBAH в толуоле. Медленно повышали температуру бани до 0 °С, наблюдалось появление желтой пены над поверхностью раствора. Нейтрализацию реакционной смеси производили 1 г воды в 5 г окиси алюминия. Реакционную массу отфильтровали на стеклянном фильтре, промыли ее двумя порциями метанола по 10 мл, растворитель удаляли. Для выделения целевого продукта применяли колоночную хроматографию на окиси алюминия. Фракции, содержащие целевое соединение объединяли, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме 1 ч при 0.2 мм рт. ст.

Выход: 180 мг (0.48 ммоль) (45 %). R_f 0.54 (система А; детекция пятен – воздействием на проявленную пластинку видимого света или 2,4-динитрофенилгидразином). Исходный нитрил (8) имел такое же соотношение (1*E*,3*Z*)- : *all-E*- изомеров, как и продукт (9) (по данным ^1H -ЯМР-спектров).

УФ-спектр [(MeOH), $\lambda_{\text{макс}}$, нм, (log ϵ): 246 (4.52); 274 (4.32); 290 (4.33); 365 (4.57).

^1H -ЯМР-спектр [(CDCl₃), δ , м.д]:

all-E-изомер: 1.17 (3H, с, 3a – CH₃), 1.30 (3H, с, 3b – CH₃), 2.36 (3H, с, 3'' – CH₃), 2.73 (3H, с, 1 – CH₃), 5.74 (1H, д, J 10.4, 3' – H), 6.04 (1H, д, J 7.9, 4'' – H), 6.52 (1H, д, J 7.9, 7 – H), 6.71 (1H, д, J 8.6, 8' – H), 6.74 (1H, д, J 15.9, 2'' – H), 6.84 (1H, т, J 7.3, 5 – H), 6.86 (1H, д, J

10.1, 4' - H), 6.97 (1H, д, J 15.9, 1'' - H), 7.06 (1H, д, J 7.3, 4 - H), 7.17 (1H, т, J 7.3, 6 - H), 7.21 (1H, с, 5' - H), 7.22 (1H, дд, J 8.3/1.9, 7' - H), 10.13 (1H, д, J 7.9, 5'' - CHO).
(1E,3Z)-изомер: 5.90 (1H, д, J 7.9, 4'' - H), 7.70 (1H, д, J 15.9, 2'' - H), 10.26 (1H, д, J 7.9, 5'' - CHO).

Масс-спектр [m/z, I_{отн}]: 371 (M⁺, 16).

Анализ: найдено (%): C 79.90, H 6.79, N 3.90; C₂₅H₂₅NO₂ вычислено (%): C 80.83, H 6.78, N 3.77.

(E)-1,3,3-Триметил-6'-(2-формил-1-этинил)индолин-2-спиро-2'-2Н-хромен (13)

Соединение (13) было получено аналогично (9) из 25 мг (0.07 ммоль) соединения (12) действием 0.1 мл 1.5 М (20 % в.в.) раствора DIBAL в толуоле.

Выход: 15 мг (0.05 ммоль) (60.0 %). R_f 0.54 (система А; детекция пятен – воздействием на проявленную пластинку видимого света или 2,4-динитрофенилгидразином).

УФ-спектр [(MeOH), λ_{макс}, нм, (log ε)]: 248 (4.52); 340 (4.42).

¹H-ЯМР-спектр [(CDCl₃), δ, м.д]: 1.18 (3H, с, 3а – CH₃), 1.30 (3H, с, 3b – CH₃), 2.74 (3H, с, 1 – CH₃), 5.77 (1H, д, J 10.3, 3' – H), 6.54 (1H, д, J 7.7, 7 – H), 6.58 (1H, дд, J 15.8/7.7, 2'' – H), 6.75 (1H, д, J 8.1, 8' – H), 6.86 (1H, тд, J 8.5/1.3, 5 – H), 6.88 (1H, д, J 10.3, 4' – H), 7.08 (1H, дд, J 7.3/1.3, 4 – H), 7.19 (1H, тд, J 7.3/1.3, 6 – H), 7.28 (1H, д, J 2.1, 5' – H), 7.34 (1H, дд, J 8.1/2.1, 7' – H), 7.37 (1H, д, J 15.8, 1''-H), 9.64 (1H, д, J 7.7, 1''H).

Масс-спектр [m/z, I_{отн}]: 331 (M⁺, 17).

Получение искусственных пигментов

Методы выделения, обесцвечивания пурпурных мембран из *Halobacterium salinarum*, а также взаимодействие аналогов ретиналя с апомембранами были отработаны нами ранее (см. [22]) и с успехом применены в данной работе.

Работа частично финансировалась за счет средств грантов президента российской федерации по поддержке молодых ученых-кандидатов наук МК-2516.2005.4 и РФФИ № 04-03-32746.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Buas-Laurent H., Durr H. // Pure Appl. Chem. 2001. V. 73. N 4. P. 639-665.
2. Berkovic G., Krongauz V., Weiss V. // Chem. Rev. 2000. V. 100. P. 1741-1753.
2. Willner I., Rubin S., Shatzmiller B., Zor T. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 8690-8694.
3. Liondagan M., Willner I. // J. Photochem. Photobiol. A-Chem. 1997. V. 108. P. 247-252.
4. Inouye M. // Coordination Chemistry Reviews. 1996. V. 148. P. 265-283.
5. Arai K., Shitara Y., Ohyama T. // J. Materials Chem. 1996. V. 6. P. 11-14.
6. Inouye M., Akamatsu K., Nakazumi H. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 9160-9165.
7. Ohya Y., Okuyama Y., Fukunaga A. Ouchi T. // Supramolecular Science. 1998. V. 5. P. 21-29.
8. Захс Э.Р., Мартынова В.П., Эфрос Л. С. // Химия гетероциклических соединений. 1979. N 4. С. 435-459.
9. Fang J.M., Carriker J.D., Balogh-Nair V., Nakanishi K. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. N 15. P. 5162-5164.
10. Balogh-Nair V., Nakanishi K. Synthetic analogs of retinal, bacteriorhodopsin, and bovine rhodopsin. // in: Methods in Enzymology. / Ed. Packer L. – N.Y.: Academic Press. V. 88 (Biomembranes), Part I, Visual pigments and purple membranes (II). 1982. P. 496-506.
11. Carotenoids. / Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Basel: Birkhauser. 1996. V. 1B.
12. Кирилова Ю.Г., Еремин С.В., Хитрина Л.В., Мицнер Б.И. // Биооргани. химия. 1993. T. 19. N. 8. С. 825-835.
13. Hoischen D., Steinmuller S., Buss V., Gartner W., Martin H.-D. // Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1997. V. 36. N 15. P. 1630-1633.
14. Rao V.J., Derguini F., Nakanishi K., Tagushi T., Hosoda A., Hanzava Y., Kobayashi Y., Pande S.M., Callendar R.H. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. N. 19. P. 6077-6078.
15. Groesbeek M., de Vries E.F.J., Berden J.A., Lugtenburg J. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1993. V. 112. N 5. P. 303-308.
16. Crano J. C., Guglielmetti R. J. Organic Photochromic and Thermochromic Compounds. New York: Plenum Press. 1999.
17. Брауде Е.В., Гальберштам М.А. // Химия гетероциклических соединений. 1979. N 2. С. 207-213.
18. Hinnen A., Audic Ch., Gautron R. // Bull. Soc. Chim. France. 1968. N 5. P. 2066-2078.
19. Брауде Е.В., Гальберштам М.А. // Химия гетероциклических соединений. 1974. N 7. С. 943-945.
20. Чунаев Ю.М., Пржигловская Н.М., Гальберштам М.А. // Химия гетероциклических соединений. 1981. N. 5. С. 649-653.
21. Лукин А.Ю. Синтез полиеновых краунсодержащих соединений. // Диссертация, к.х.н., Москва, МИТХТ им. Ломоносова, 2004.

К.В. Серёгин
аспирант,
Н.А. Ильякова
студент группы БМ-69,
М.В. Чудинов
ассистент,
В.И. Швец
академик РАМН
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СИНТЕЗ НОВЫХ 3'-N-АЦИЛЬНЫХ И 3'-N-АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3'-АМИНО-3'- ДЕЗОКСИТИМИДИНА

УДК 547.854.4'455.522.057+615.012.1

Получен ряд новых 3'-N-ацильных производных 3'-амино-3'-дезокситимидина путем конденсации нуклеозида с карбоновыми кислотами, а также проведено его алкилирование эфирами α, β -ненасыщенных карбоновых кислот с получением новых 3'-N-алкильных производных.

Введение.

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) - одна из болезней, вызывающих большое беспокойство в обществе. Для этого заболевания до сих пор не существует терапии, приводящей к полному выздоровлению. Продолжающееся во всем мире распространение этой болезни требует широких научных и клинических исследований, направленных на понимание механизма и борьбу с ней. На данный момент наиболее эффективной оказывается комбинированная терапия с помощью так называемых анти-ВИЧ "коктейлей", состоящих из (i) нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ (NRTI) (зидовудин, ставудин, ламивудин), (ii) ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ (NNRTI) (невирапин, делавирдин, эфавиренц) и (iii) ингибитора протеазы (ритонавир, индинавир) [1]. Хотя жизненный цикл вируса предоставляет много возможных мишеней для атаки различными химическими агентами, и разработки ведутся не только в области ингибирования выше упомянутых жизненно важных для вируса ферментов, поиски ингибиторов именно этих трех типов ведутся наиболее широко.

Азидотимидин, 3'-азидо-3'-дезокситимидин (1), являющийся NRTI, был первым лекарством, официально принятым для лечения СПИДа. Высокая анти-ВИЧ активность этого соединения побудила многих исследователей к поиску более эффективных соединений среди веществ подобного типа. В частности проводились многочисленные исследования производных тимидина, содержащих по 3'-положению атом азота [2-7]. Один из представителей этих соединений - 3'-амино-3'-дезокситимидин (2) - способен эффективно ингибировать работу некоторых ДНК-полимераз, в том числе и обратную транскриптазу ВИЧ [8], обладает противоопухолевыми свойствами [9,10], но, к сожалению, не может использоваться в клинической практике ввиду высокой токсичности [11]. Поиск потенциальных фармакофоров в ряду его производных велся довольно широко [12, 13].

Обсуждение результатов.

Возможности модификации аминотимидина чрезвычайно широки, а многие из полученных соединений также являются активными веществами. Представляется возможным модификация аминотимидина путем ацилирования 3'-аминогруппы и получения соединений, представляющих собой депо-формы аминотимидина с приемлемым соотношением активность/токсичность, способных гидролизиться *in vivo* до активной формы. Другой возможной модификацией является алкилирование 3'-аминогруппы различными алкилирующими агентами. Это позволит сохранить основность 3'-аминогруппы, от которой,

возможно, зависит активность аминотимидина, и снизить токсичность [14].

Нами был получен ряд 3'-N-ацилированных производных аминотимидина (3a-e) путем конденсации аминотимидина с соответствующими кислотами.

Конденсация проводилась с помощью гексафторфосфат-(бистриазол-1-илокси)-трис-(диметиламино)-фосфония (BOP-реагент) в диметилформамиде при комнатной температуре в присутствии диизопропилэтиламина (ДИЭА) (рис.1).

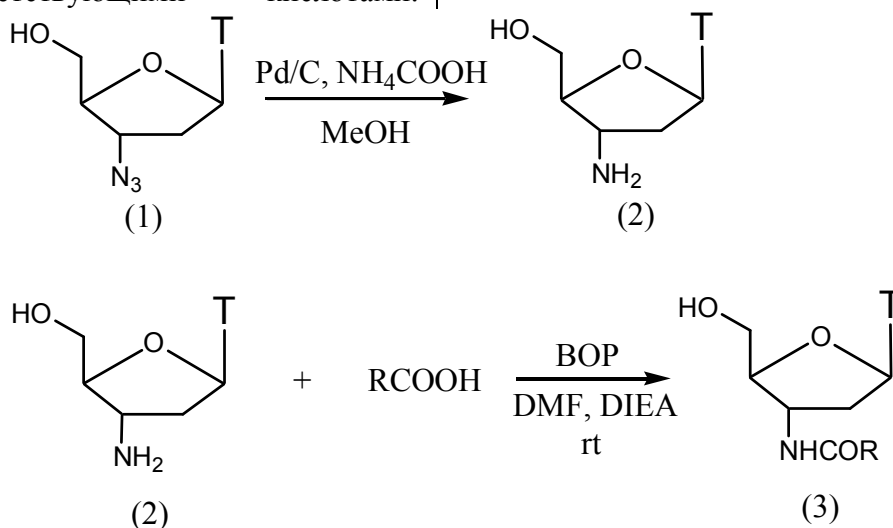


Рисунок 1.

Используемый нами BOP-реагент ранее не упоминался в литературе как конденсирующий агент для ацилирования аминотимидина кислотами, хотя в работе [15] использовали конденсирующий агент EEDQ для ацилирования аминотимидина уксусной кислотой.

Для ацилирования применяли 3-бензоилпропионовую, 2-(4,5-дифенил-1H-пиразол-1-ил)-уксусную, гидрокоричную, изоникотиновую и *O*-анисовую кислоты. Выходы продуктов колебались от среднего

(54% для 3-бензоилпропионовой кислоты) до высокого (90% для *O*-анисовой кислоты) (табл. 1). Все реакции проводили на незащищенном аминотимидине, который получали каталитическим восстановлением (Pd/C) 3'-дезоксиз-3'-азидотимидина (1) формиатом аммония [16]. Попытка провести конденсацию с акриловой кислотой не удалась, вероятно, из-за протекания конкурентного присоединения по Михаэлю к двойной связи акриловой кислоты.

Таблица.1. Выходы реакций конденсации 3'-амино-3'-дезокситимидина с различными кислотами

(3)	Вещество	Выход
a	<i>O</i> -анисовая кислота	90
b	изоникотиновая кислота	76
c	2-(4,5-дифенил-1H-пиразол-1-ил)-уксусная кислота	67
d	3-бензоилпропионовая кислота	54
e	гидрокоричная кислота	75

В качестве алкилированных производных аминотимидина нами были получены соединения (4) и (5), являющиеся продуктами моно- и диакилирования аминотимидина этилакрилатом, протекающего как присоединение по Михаэлю (рис.2). Реакцию аминотимидина с этилакрилатом проводили в абсолютном

метаноле при 50°C. Выход продукта моноалкилирования составил 95%. Провести повторное алкилирование в тех же условиях не удалось. Поэтому повторное алкилирование проводили в кипящем изопропанол в присутствии КОН. После очистки на хроматографической колонке продукт был получен с выходом 85%.

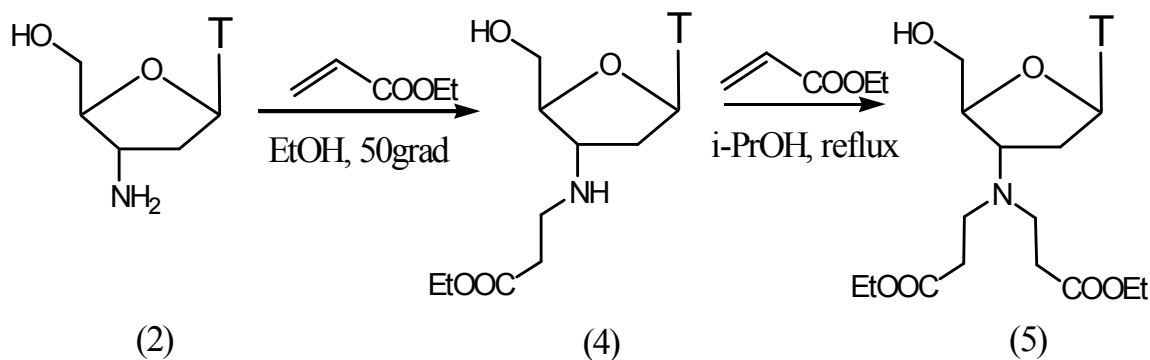


Рисунок 2.

Попытка алкилировать аминотимидин метиловым эфиром итаконовой кислоты привела к образованию лактама (6). Вероятно, реакция протекает через присоединения по Михаэлю по метиленовой группе итаконовой кислоты, за которым происходит немедленное замыкание продукта присоединения в пятичленный лактам (Рис.3).

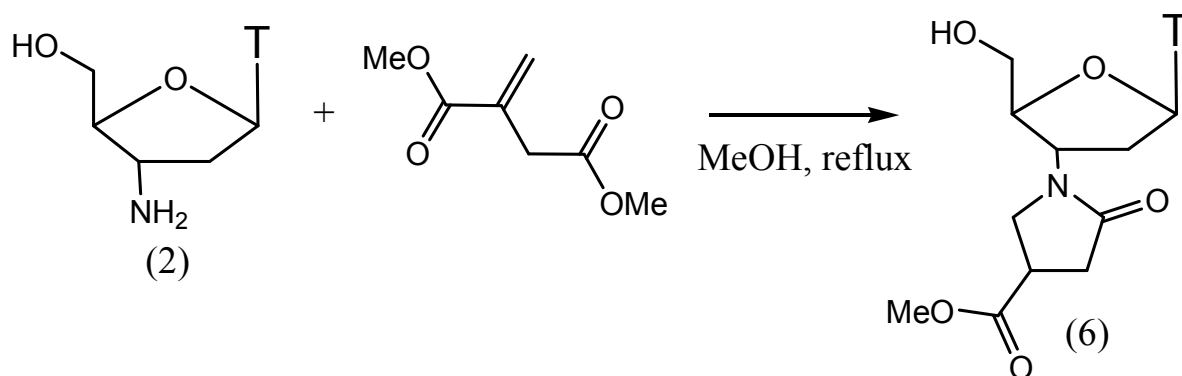


Рисунок 3

Экспериментальная часть.

В работе применялись реактивы производства фирм Merk (Германия), Lancaster (США), Fluka (Швеция) и отечественного производства. Использовались перегнанные растворители отечественного производства. Метанол и этанол перед использованием абсолютировались.

Для проведения ТСХ использовались хроматографические пластинки Kieselgel F₂₅₄ (Merk, Германия). ТСХ проводили в системах: А - 100%хлороформа, Б - 10%метанола-90%хлороформа, В - 20%метанола-80%хлороформа.

Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля Kieselgel 60.

Спектры ¹H-ЯМР регистрировались на приборе MSL200 (Bruker, Германия) с резонансной частотой протонов 200,13МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях.

3'-дезоксидеокси-3'-(о-метоксибензоиламидо)-тимидин (3a)

100мг (0,41ммоль) 3'-амино3'-дезокситимидина, при перемешивании, растворили в 3мл ДМФА и добавили 70мг (0,46ммоль) о-анисовой кислоты, 203мг (0,46ммоль) ВОР, 0,07мл (0,5ммоль) ДИЭА. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе А. R_f конечного продукта ~0,8. По окончании реакции (2часа) реакционную массу разбавили 20% раствором K₂CO₃, экстрагировали этилацетатом (20x2), затем промыли объединенные органические экстракты насыщенным раствором NaCl (10мл) и высушили над Na₂SO₄. Затем удалили растворитель в вакууме. Хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – хлороформ). Выход 140мг (90%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 8,42 (д., 1H, 3'-NH), 7,68-7,01 (м., 6H, H-5, бензоил), 6,22 (т., 1H, H-1'), 4,55 (м., 1H, H-4'),

3,92 (м., 1H, H-3'), 3,61 (д., 2H, H-5'), 3,29 (с., 3H, CH₃O-Phe), 2,28 (м., 2H, H-2'), 1,80 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-дезоксизоникотинамидотимидин (3b)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 56мг (0,46ммоль) изоникотиновой кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,5. По окончании реакции (2 часа) реакционную массу разбавили 20% раствором K₂CO₃, экстрагировали этилацетатом (20x2), затем промыли объединенные органические экстракты насыщенным раствором NaCl (10мл) и высушили над Na₂SO₄. Затем удалили растворитель в вакууме. Растворили остаток горячим этанолом, охладили раствор до комнатной температуры и добавили 4 капли 4М HCl в диоксане. Выпавшие кристаллы желтоватого цвета отфильтровали и сушили в вакууме (1 мм рт.ст.) в течение 3 часов. Выход 110мг (76%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 9,07 (д., 2H, C₂, C₆-Py), 8,42 (д., 1H, 3'-NH), 7,96 (д., 2H, C₃, C₅-Py), 7,59 (д., 1H, H-6), 6,22 (т., 1H, H-1'), 4,55 (м., 1H, H-4'), 3,92 (м., 1H, H-3'), 3,61 (д., 2H, H-5'), 2,28 (м., 2H, H-2'), 1,80 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-дезоксизоникотинамидотимидин (3c)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 122мг (0,46ммоль) 2-(4,5-дифенил-1H-пиразол-1-ил)-уксусной кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. Выделение целевого продукта проводилось также, как и для (3a). Выход 130мг (67%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 9,24 (д., 1H, 3'-NH), 7,66 (д., 1H, H-6), 7,45 (д., 4H, C₂, C₆-Phe), 6,21 (т., 1H, H-1'), 4,71 (с., 2H, -NHCOCH₂-), 4,53 (м., 1H, H-3'), 3,92 (м., 1H, H-4'), 3,78 (д., 2H, H-5'), 2,36 (м., 2H, H-2'), 1,92 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-(3-бензоилпропионамидо)-3'-дезокситимидин (3d)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 82мг (0,46ммоль) 3-бензоилпропионовой кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе А. R_f конечного продукта ~0,8. Выделение целевого продукта проводилось также, как и для (3a). Выход 90мг (54%). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) 7,96 (д., 2H, C₅, C₃-Phe), 7,61 (д., 1H, H-6), 7,50 (т., 2H, C₆, C₂-Phe), 6,21 (т., 1H, H-1'), 4,33 (т., 1H, H-4'), 3,78 (т., 1H, H-3'), 3,62 (м., 2H, H-5'), 3,25 (т., 2H, -NCOCH₂-), 2,19 (м., 2H, H-2'), 1,77 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-дезоксизоникотинамидотимидин (3e)

Условия реакции те же, что и для (3a), но с 69мг (0,46ммоль) гидрокоричной кислоты. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,9. Выделение целевого продукта проводилось также, как и для (3a), но хроматографировали с элюентом этилацетатом. Выход 100мг (75%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) 7,96 (д., 1H, 3'-NH), 7,71 (д., 1H, H-6), 6,04 (т., 1H, H-1'), 4,44 (т., 1H, H-4'), 3,87 (м., 1H, H-3'), 3,61 (д., 2H, H-5'), 2,96 (т., 2H, -NHCH₂CH₂-), 2,51 (т., 2H, -NHCH₂CH₂-), 2,22 (м., 2H, H-2'), 1,93 (с., 3H, 5-CH₃).

3'-амино-3'-дезоксизоникотинамидотимидин (4)

1г (4,1ммоль) 3'-амино-3'-дезокситимидина растворили в 20 мл этанола и при перемешивании добавили 1,35мл (12ммоль) этилового эфира акриловой кислоты. Кипятили в течение 12 часов. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе В. R_f конечного продукта ~0,85. После окончания реакции растворитель удалили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке (элюент: хлороформ-метанол, градиент метанола 0-5%). Выход 1,41г (95%). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) 7,72 (с., 1H, H-6), 6,08 (т., 1H, H-1'), 4,05 (м., 2H, -COOCH₂CH₃), 3,9 (м., 2H, H-5'), 3,65 (м., 1H, H-4'), 3,22 (м., 1H, H-3'), 2,72 (т., 2H, -CH₂COOEt), 2,4 (т., 2H, -CH₂CH₂COOEt), 2,06 (м., 2H, H-2'), 1,77 (с., 3H, 5-CH₃), 1,18 (т., 3H, -COOCH₂CH₃).

3'-амино-3'-N,N-ди-(β-этоксикарбонилэтил)-3'-дезокситимидин (5)

0,675г (2ммоль) соединения (4a) растворили в изопропанолу и при перемешивании добавили 0,64мл (6ммоль) этилового эфира акриловой кислоты и каталитическое количество КОН. Раствор кипятили в течение четырех суток. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,85. Затем удалили растворитель в вакууме. Хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент: ПЭЛ – хлороформ, градиент ПЭЛ 50-10%). Выход 750мг (85%). ^1H -ЯМР (CDCl_3) 7,82 (д., 1H, H-6), 6,10 (т., 1H, H-1'), 4,04 (м., 4H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 3,66-3,28 (м., 3H, H-3',5'), 2,75-2,53 (м., 2H, 3'- NCH_2), 2,40-2,06 (м., 2H, 3'- NCH_2), 2,12 (м., 2H, H-2'), 1,82 (с., 3H, 5- CH_3), 1,18 (т., 6H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

3'-дезоксигуанидин-3'-(3-этоксикарбонил-5-пирролидон-1-ил)-тимидин (6).

К раствору 1,5г (2ммоль) 3'-амино-3'-дезокситимидина в 25мл метанола добавили 2,15г (14ммоль) диметилового эфира итаконовой кислоты. Раствор кипятили в течение 72 часов. Контроль реакции осуществляли методом ТСХ в системе Б. R_f конечного продукта ~0,3. Затем реакционную смесь экстрагировали петролейным эфиром (2x20мл). Удалили растворитель в вакууме из объединенных органических фракций. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент: ПЭЛ-хлороформ, градиент ПЭЛ 50-0%). Выход 1,7г (89%). ^1H -ЯМР (CDCl_3) 6,14 (т., 1H, H-1'), 4,72 (м., 1H, H-4'), 3,90 (м., 2H, H-5'), 3,70-3,62 (м., 6H, H-3', $-\text{COOCH}_3$, 3'- NCH_2), 3,31-2,70 (м., 2H, CH_2 пирролидона), 2,74-2,29 (м., 2H, H-2'), 1,89 (с., 3H, 5- CH_3).

ЛИТЕРАТУРА:

1. DeClercq E.//Current Medicinal Chemistry, 2001, P.1543 - 1572
2. Celewicz L., Urjasn W., Golankiewicz K.//Nucleosides & Nucleotides, 1993, v.12, №9, P.951 - 966
3. Chung K., Raymond F., Moon K., Giliyar V., Zi P.//J. Med. Chem., 1989, V.32, P.612 - 617
4. Wigerinck P., Van Aerceshot A., Janssen G., Claes P.//J. Med. Chem., 1990, V.33, P.868 - 873
5. Zehl A., Cech D.//Libigs Ann., 1997, P.595 - 600
6. Handlon A., Oppenheimer N.//Pharm. Res., 1988, P.297 - 299
7. Leffler J., Temple R.//J. Am. Chem. Soc., 1967, P.5235 - 5245
8. Krenitsky T., Freeman G., Shaver S., Beacham III L., Hurlbert S.//J. Med. Chem., 1983, V.26, P.891 - 895
9. Lin T., Prusoff W.//J. Med. Chem., 1978, V.21, P.109 - 112
10. Ashida N., Asano S., Kohda K.//Anticancer Res., 1994, V.14, P.2061 - 2062
11. Cretton E., Sommadossi J. //Drug Metab. Dispos., 1993, V.21, P.946 - 950
12. Maillard M., Faraj A., Frappier F., Florent J.-C., Grierson D., Monneret C.//Nucleic Acids Res. Suppl., 2001, P.121 - 122
13. Pannecouque C., Van Poppel K., Balzarini J., Claes P., De Clercq E., Herdewijn P.//Nucleosides & Nucleotides, 1995, V.14, №3-5, P.541 - 544
14. Jasko M., Fedorov I., Atrazhev A.//Nucleosides & Nucleotides, 1995, V.14, №1&2, P.23 - 37
15. Hampton A., Kappler F., Chawia R.//J. Med. Chem., 1979, V.22, №6, P.621 - 631.

Н.В. Коновалова
 ассистент,
Е.В. Кириенко
 студент группы БМ-69,
В.Н. Лузгина
 старший научный сотрудник
 кафедры Биотехнологии
 МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАД НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНА

УДК 547.979.733

Получены диады, состоящие из 2-(2-карбоксивинил)-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина и цинкового комплекса 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина. Изучены спектральные и фотофизические свойства полученных соединений.

Искусственные структурно-организованные ансамбли на основе порфиринов представляют большой интерес в качестве потенциальных энергопреобразующих и электронных схем молекулярного масштаба. Возбуждение донорных пигментов в таких ансамблях обеспечивает эффективное, а в ряде случаев и направленное, преобразование энергии солнечного света путем переноса энергии и электрона [1,2]. Дипорфириновые системы, в которых расстояние между компонентами и их взаимная ориентация обуславливают возможность эффективного протекания фотофизических процессов, являются наиболее простыми и удобными моделями для изучения парных взаимодействий между пигментами в более обширных ансамблях [3-5]. В связи с этим синтез структурно организованных диад на основе порфиринов является актуальной задачей при создании новых энергопреобразующих систем.

Целью данной работы являлось получение новых дипорфириновых систем, состоящих из цинкового комплекса 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина и свободного основания 2-(2-карбоксивинил)-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина, которые имеют различную конфигурацию двойной связи в составе связывающего мостика. Введение металла в один из тетрапиррольных

макроциклов является эффективным подходом для повышения энергии синглетного возбужденного состояния порфирина и, таким образом, облегчает перенос энергии внутри системы [6]. Различное взаимное расположение двух порфириновых компонент в полученных модельных соединениях позволит в дальнейшем детально изучить зависимость процесса переноса энергии от расстояния между донором и акцептором и их взаимной ориентации.

Для получения 5-(*p*-нитрофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина (1) проводили конденсацию пиррола с бензальдегидом и *p*-нитробензальдегидом в соотношении 4:3:1 в кипящем *o*-ксилоле, в качестве катализатора использовали моноклоруксусную кислоту [7]. Образующийся порфириноген окисляли 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном (DDQ) в присутствии кислорода воздуха. В ходе реакции помимо целевого соединения 1 и тетрафенилпорфирина образовывались ди-, три- и тетранитрозамещенные производные тетрафенилпорфирина, которые имели гораздо меньшее значение R_f , что позволило легко отделить их хроматографически на окиси алюминия. Смесь порфирина 1 и тетрафенилпорфирина вводили в последующую реакцию восстановления NO_2 -группы под действием хлорида олова в соляной кислоте [7]. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ. Порфирин 2 имел значение R_f 0.2 в бензоле, что значительно меньше, чем R_f тетрафенилпорфирина (0.7) и исходного порфирина 1 (0.6) в той же системе. Это позволило легко отделить продукт реакции 2, выход которого в расчете на исходный пиррол составил 4%. Порфирин 2 был

затем превращен в цинковый комплекс 3 обработкой раствором ацетата цинка в смеси хлороформ – метанол при кипячении в течение 40 минут. Выход продукта 3 составил 96%.

Исходным соединением для получения 2-(2-карбоксивинил)-5,10,15,20-

тетрафенилпорфирина (9) служил тетрафенилпорфирин (4), который превращали в медный комплекс 5 и затем формилировали по Вильсмейеру. При этом был получен моноформилпорфирин 6 с выходом 88%.

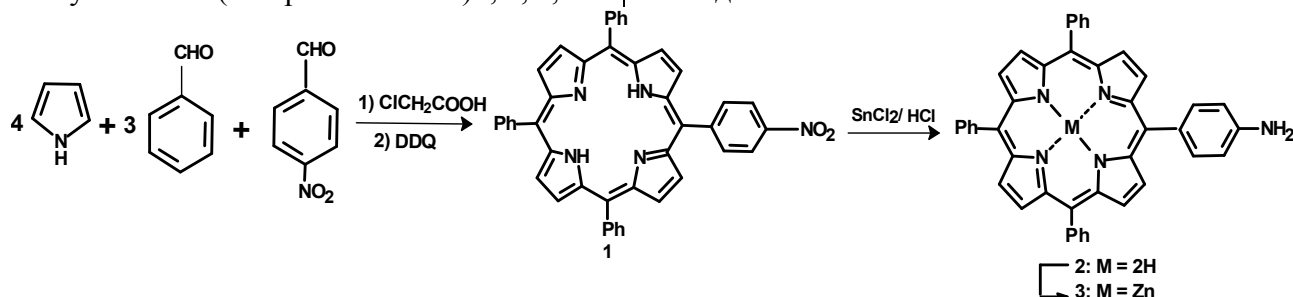


Рис. 1. Схема синтеза цинкового комплекса 5-(п-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина.

Наличие реакционноспособной альдегидной группы в β -положении порфиринового макроцикла позволило провести по ней реакцию Виттига с метоксикарбонилметилентрифенилфосфораном согласно методике [8].

В результате реакции были получены два соединения, которые легко удалось

разделить хроматографически. Наличие в масс-спектре смеси полученных соединений одного сигнала молекулярного иона $[M]^+$ с m/z 760.4 позволило приписать им строение двух изомеров эфира акриловой кислоты 7. Выход Z- и E-изомера составил 29 и 45%, соответственно.

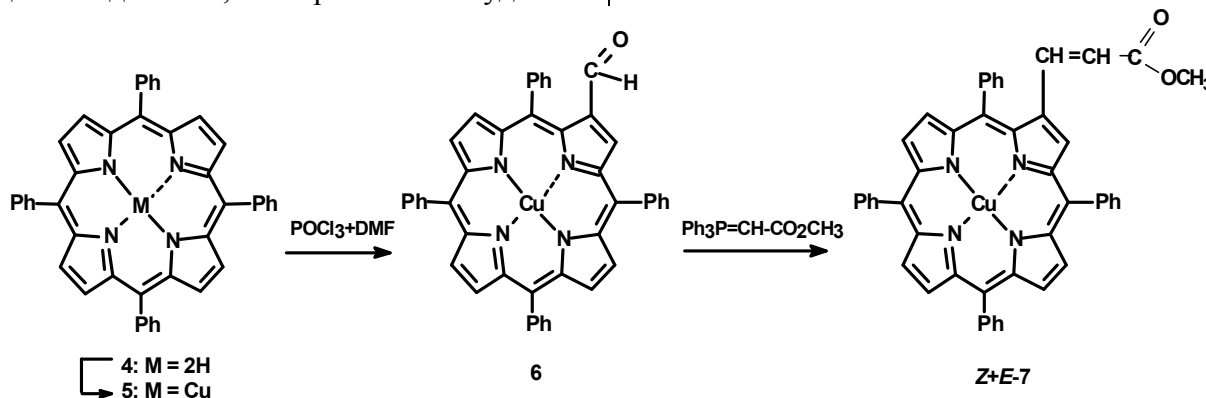


Рис. 2. Схема синтеза Z- и E-изомеров 2-(2-метоксикарбонил)винил-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина.

Каждый из изомеров Z-7 и E-7 обрабатывали хлорокисью фосфора с водой по методу [8], в результате были получены безметалльные порфирины Z-8 и E-8 с выходами 91 и 93%, соответственно. Омыление сложноэфирных групп в последних 2N водным раствором КОН в пиридине при кипении давало кислоты Z- и E-изомеры 2-(2-карбокси)винил-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина 9 с выходами 36 и 40.5%, соответственно. Для подтверждения конфигурации двойной связи в полученных изомерах порфирина 9 использовали спектроскопию ЯМР ^1H . В спектре E-изомера порфирина 9 константа

спин-спинового взаимодействия протонов при двойной связи составляет 15 Гц, а в спектре Z-изомера – 12 Гц, что совпадает с литературными данными [9].

Для получения димеров 10 сначала проводили активацию карбоксильной группы Z- и E-изомеров порфирина 9 обработкой тионилхлоридом в бензоле при комнатной температуре [10]. Образующийся активный хлорангидрид без выделения вводили в конденсацию с цинковым комплексом аминоксодержащего порфирина 3 в присутствии диметиламинопиридина (ДМАП), необходимого для связывания выделяющегося хлороводорода.

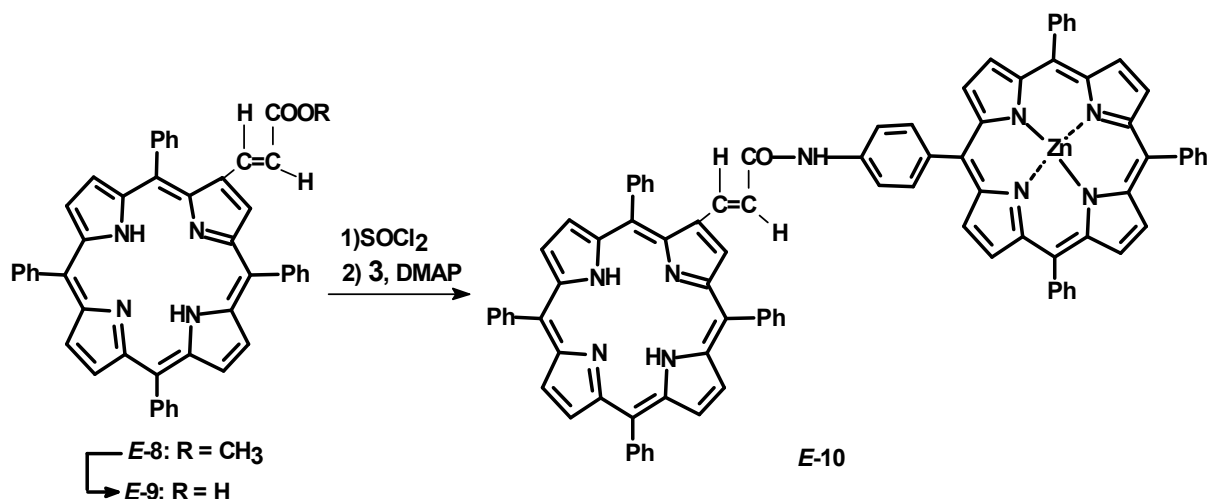


Рис. 3. Схема синтеза E-изомера дипорфирина 10.

Индивидуальность дипорфириновых соединений *Z*-10 и *E*-10 доказана методом ТСХ, структура подтверждена данными электронной, ИК-, ^1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. В ИК-спектрах дипорфиринов отмечено наличие сигналов валентных колебаний группы C=O амидной связи (амид I) при 1642 см^{-1} для *E*-изомера 10 и при 1610 см^{-1} для *Z*-изомера 10. Сигналы деформационных колебаний группы NH амидной связи (амид II) наблюдаются при 1583 см^{-1} для *E*-изомера и при 1517 см^{-1} для *Z*-изомера. Валентные колебания группы NH находятся при 3417 см^{-1} для *E*-изомера и при 3408 см^{-1} для *Z*-изомера, что характерно для вторичных амидов [11]. В масс-спектрах *E*- и *Z*-изомеров дипорфирина 10 присутствовали сигналы молекулярных ионов $[\text{M}]^+$ с m/z 1358.

Проведено предварительное исследование фотофизических свойств полученных дипорфиринов *Z*-10 и *E*-10 методами стационарной электронной и флуоресцентной спектроскопии. Электронные спектры дипорфиринов 10, измеренные в хлороформе при комнатной температуре, напоминают сумму электронных спектров составляющих их порфиринов. На границе УФ- и видимой области в спектре дипорфирина *E*-10 имеется одна широкая полоса поглощения при 423.2 нм , которая находится между полосами Соре цинкового комплекса 3 при 419 нм и порфирина *E*-9 при 430.6 нм . Полоса поглощения IV в видимой области

электронного спектра димера *E*-10 соответствует полосе поглощения порфирина *E*-9 (522.8 нм), но немного сдвинута в длинноволновую область (рис. 4). Полоса поглощения III в спектре дипорфирина *E*-10 характеризуется большой интенсивностью и гипсохромным сдвигом и может быть обусловлена аддитивным вкладом двух полос: β -полосы поглощения цинкового комплекса 3 (555.0 нм) и полосы поглощения III порфирина *E*-9 (561.2 нм). Полоса поглощения II в спектре димера *E*-10 (599.8 нм) находится между α -полосой поглощения цинкового комплекса (596.2 нм) и II полосой поглощения безметалльного порфирина *E*-9 (601.8 нм). Полоса поглощения I в спектре дипорфирина *E*-10 соответствует полосе поглощения порфирина *E*-9 (657.0 нм), но сдвинута в коротковолновую область. Для *Z*-изомера 10 электронный спектр имеет аналогичный вид. Промежуточное положение максимумов полос поглощения дипорфиринов *E*- и *Z*-10 между максимумами поглощения порфиринов 3 и 9 является указанием на то, что в дипорфириновых системах в основном состоянии происходит смешивание электронных структур компонентов.

Спектры флуоресценции полученных дипорфиринов *Z*-10 и *E*-10 (рис. 5) были записаны для растворов веществ в хлороформе при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

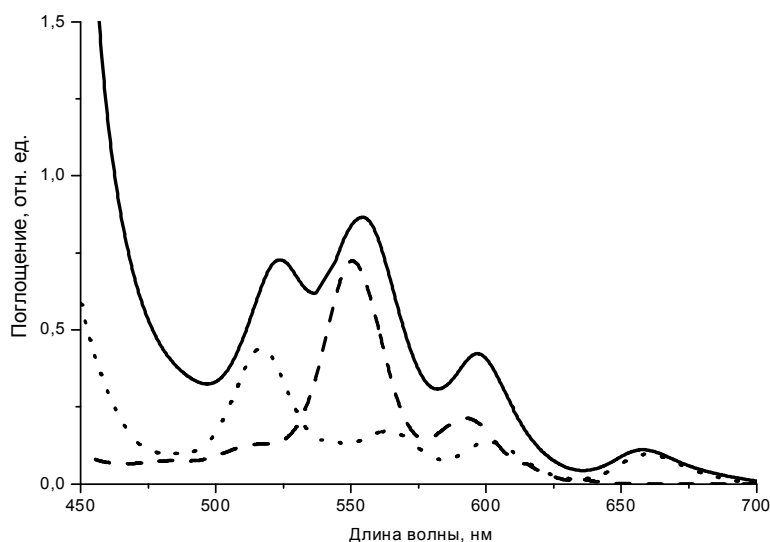


Рис. 4. Электронные спектры поглощения цинкового комплекса порфирина 3 (---), порфирина *E*-9 (···) и димера *E*-10 (—).

Возбуждение димера *E*-10 осуществляли в полосу поглощения 550 нм, где максимально поглощает цинковый комплекс 3, а порфирин *E*-9 характеризуется минимальной экстинкцией (рис. 4). При этом наблюдали спектр флуоресценции, имеющий максимумы при 678 и 738 нм, что соответствует эмиссии свободного основания *E*-9 (679 и 739 нм) (рис. 5а).

Аналогичные спектральные данные были получены для *Z*-изомера порфирина 10 (рис. 5б). Из представленных результатов можно сделать вывод о протекании эффективного внутримолекулярного переноса энергии возбуждения от цинксодержащей компоненты к безметалльному основанию в полученных дипорфириновых соединениях [3, 12, 13].

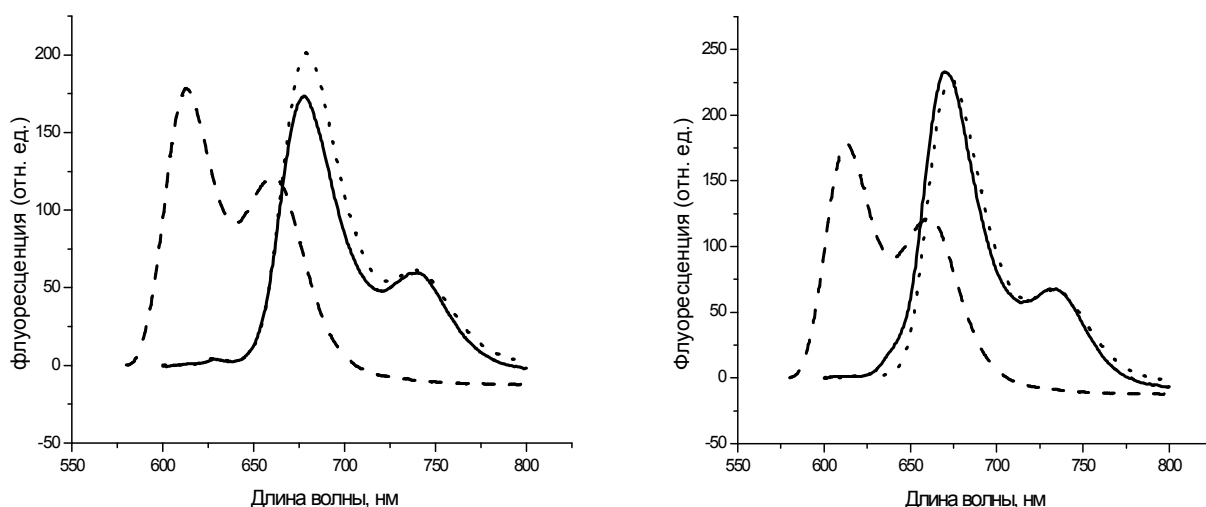


Рис. 5. Спектры флуоресценции: цинкового комплекса порфирина 3 (---), порфирина *E*-9 (···) и димера *E*-10 (—) (а), цинкового комплекса 3 (---), порфирина *Z*-9 (···) и димера *Z*-10 (—) (б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали пиррол, 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон и метоксикарбонилметилентрифенилфосфоран фирмы Fluka. Пиррол и бензальдегид перегоняли в вакууме при пропускании тока аргона, *o*-ксилол перегоняли над натрием, N,N-диметилформамид перегоняли под вакуумом в присутствии смеси бензола с водой в соответствии со стандартной методикой, дихлорэтан и бензол перегоняли над пятиокисью фосфора, хлористый тионил перегоняли над оливковым маслом, хлористый метилен перегоняли над хлористым кальцием, пиридин перегоняли над гидроксидом калия, петролейный эфир перегоняли, собирали фракцию с $T_{\text{кип}} = 58-64^{\circ}\text{C}$.

Индивидуальность полученных соединений и ход реакций контролировали ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier). Очистку веществ проводили колоночной хроматографией на силикагеле G 60 "Merck" (Германия).

Электронные спектры полученных соединений регистрировали на спектрофотометре Jasco UV-7800 при комнатной температуре в хлороформе. Готовили растворы порфиринов с концентрацией $\sim 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л для полосы Core и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л для видимой области. ИК-спектры были зарегистрированы на приборе Shimadzu IR-435 (Япония) в пленке растворителя. Спектры ЯМР ^1H регистрировали на приборе Bruker MSL-200 с рабочей частотой 200 МГц, измерения проводили в шкале δ , внутренний стандарт – тетраметилсилан, растворитель – CDCl_3 . Масс-спектры были получены на спектрометре Vision 2000 методом MALDI, используя 2,4,5-тригидроксиацетофеноновую матрицу. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Jasco FP-777 (Япония) для растворов веществ в хлороформе при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Е-изомер 5-п-[(5,10,15,20-тетрафенилпорфирин-2-ил)винил-карбонил] аминифенил-10,15,20-трифенилпорфината цинка (Е-10). К раствору 14 мг (0.021 ммоль) Е-изомера порфирина 9 в 2 мл безводного бензола прибавляли 70 мкл тионилхлорида и перемешивали при 20°C 3 часа. Ход реакции контролировали ТСХ в системе хлороформ - метанол 9:1. Растворитель и тионилхлорид удаляли в вакууме. К высушенному остатку прибавляли раствор 10.85 мг (0.016 ммоль) цинкового комплекса 3 и 15 мг ДМАП в 3.5 мл бензола. Реакционную массу перемешивали при 20°C 36 часов, затем промывали 36 мл 1н HCl и водой, экстрагировали бензолом, растворитель удаляли в вакууме. Продукт очищали на колонке (1×15 см) с силикагелем, элюировали системой хлористый метилен - петролейный эфир 2:1. Собирали фракцию с R_f 0.5 в системе хлороформ - петролейный эфир 3:1. Растворитель удаляли в вакууме. Осадок переосаждали из смеси гексан - хлороформ. Выход: 6 мг (16 %). Электронный спектр (λ_{max} , нм): 423.2, 523.6, 554.3, 599.8, 655.8. ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3417 (вал. NH), 2917 (вал. $-\text{CH}=\text{CH}-$), 1642 (амид I), 1583 (амид II), 1017 (вал. $-\text{CH}=\text{CH}-$). Спектр ^1H ЯМР (δ , м.д.): 8.95-8.20 (15H, м, β -H); 8.23-7.78 (39H, м, Ph); 7.20 (1H, д, $J=18$ Гц, $\text{CH}=\text{CHCO}$); 6.75 (1H, д, $J=18$ Гц, $\text{CH}=\text{CHCO}$); -2.60 (1H, с, NH). Масс-спектр, m/z : 1358 $[\text{M}]^+$.

Z-изомер 5-п-[(5,10,15,20-тетрафенилпорфирин-2-ил)винил-карбонил] аминифенил-10,15,20-трифенилпорфината цинка (Z-10). Получен по аналогичной методике из 12 мг (0.018 ммоль) Z-изомера порфирина 9 и 9.3 мг (0.013 ммоль) цинкового комплекса 3. Выход: 3 мг (13%). R_f 0.3 в системе хлороформ - петролейный эфир 4:1. Электронный спектр, λ_{max} , нм: 420.0, 520.2, 549.8, 593.6, 650.0. ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3408 (вал. NH), 2917 (вал. $-\text{CH}=\text{CH}-$), 1610 (амид I), 1517 (амид II), 1019 (вал. $-\text{CH}=\text{CH}-$). Спектр ^1H ЯМР (δ , м.д.): 8.92-8.21 (15H, м, β -H); 8.23-7.75 (39H, м, Ph); 7.22 (1H, д, $J=13$ Гц, $\text{CH}=\text{CHCO}$); 6.93 (1H, д, $J=13$ Гц, $\text{CH}=\text{CHCO}$); -2.70 (1H, с, NH). Масс-спектр, m/z : 1358 $[\text{M}]^+$.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Fukuzumi S. New perspective of electron transfer chemistry. *Org. Biomol. Chem.*, 2003, V. 1, P. 609-620.
2. Gust D., Moore T.A., Moore A.L. Mimicking photosynthetic solar energy transduction. *Acc. Chem. Res.*, 2001, V. 34, № 1, P. 40-48.
3. Osuka A., Tanabe N., Kawabata S., Yamazaki I., Nishimura Y. Synthesis and intramolecular electron- and energy-transfer reactions of polyene- and polyene-bridged diporphyrins. *J. Org. Chem.*, 1995, V. 60, № 22, P. 7177-7185.
4. Kawabata S., Yamazaki I., Nishimura Y., Osuka A. Singlet energy transfer in bis(phenylethynyl)phenylene-bridged zinc-free base hybrid diporphyrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, № 3, P. 479-484.
5. Strachan J.-P., Gentemann S., Seth J., Kalsbeck W.A., Lindsey J.S., Holten D., Bocian D.F. Synthesis and characterization of tetrachlorodiarylethyne-linked porphyrin dimmers. Effect of linker architecture on intradimer electronic communication. *Inorg. Chem.*, 1998, V. 37, № 6, P. 1191-1201.
6. Shinoda S., Tsukube H., Nishimura Y., Yamazaki I., Osuka A. Energy and electron transfer properties of methyl pheophorbide-a in zinc porphyrin- pheophorbide dyads. *Tetrahedron*, 1997, V. 53, № 40, P. 13657-13666.
7. Грибкова С.Е., Лузгина В.Н., Евстигнеева Р.П. Синтез производных тетрафенилпорфирина, ковалентно связанных с тирозином. *Журн. орг. химии*, 1993, Т. 29, № 4, С. 758-762.
8. Пономарев Г.В., Маравин Г.Б. Синтез и свойства 1-замещенных производных 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина. *Химия гетероцикл. Соединений*, 1982, № 1. С. 59 – 64.
9. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М. Мир, 1976. С. 302.
10. Fungo F., Otero L.A., Sereno L., Silber J.J., Durantini E.N. Synthesis of porphyrin dyads with potential use in solar energy conversion. *J. Mater. Chem.*, 2000, V. 10, P. 645-650.
11. Беллами Л. Инфракрасные спектры молекул. М. Изд-во иностранной литературы, 1957.
12. Anton J.A., Loach P.A. Transfer of excitation energy between porphyrin centers of a covalently linked dimer. *Photochem. Photobiol.*, 1987, № 28, P. 235-242.
13. Hsiao J.-S., Krneger B.P., Wagner R.W., Jonson T.E., Delaney J.K., Mauzerall D.C., Fleming G.R., Lindsey J.S., Bocian D.F., Donohoe R.J. Soluble synthetic multiporphyrin arrays. 2. Photodynamics of energy-transfer processes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, V. 118, № 45, P. 11181-11193.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 04-03-32687) и грантов Президента Российской Федерации №№ МК-3678.2005.3 и НШ-2013.2003.3

Ю.Л. Себякин,
профессор,
У.А. Буданова
аспирант

*кафедра Химии и технологии
биологически активных соединений
им. Н.А. Преображенсокого
МИТХТ им. М.В. Ломоносова*

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА – СВОЙСТВА В РЯДУ КАТИОННЫХ ЛИПОПЕПТИДОВ

УДК 547.466+547.395

Осуществлён синтез липодипептидов, содержащих ArgGlu, OrnGlu, OrnGln, LysGlu, LysGln. Амфифильные свойства обеспечивались за счёт образования ди- и моноэфиров глутаминовой кислоты и глутамина с различными по длине алифатическими спиртами. Для полученных соединений определены параметры ККМ и выявлена взаимосвязь между структурой и свойствами.

Доставка нуклеиновых кислот, белков и некоторых лекарственных веществ в клетку, необходимая для проявления терапевтического эффекта, затруднена неспособностью этих веществ самостоятельно преодолевать плазматическую мембрану. Поэтому необходимо создание транспортных систем, которые могут проникать сквозь мембрану за счёт процессов слияния или эндоцитоза. Известно, что агрегаты, образованные в водной среде катионными алифатическими производными аминокислот и пептидов, способны эффективно проникать в клетку [1] и являются нетоксичными и биodeградируемыми [2]. Кроме того, разнообразие реакционноспособных функциональных группировок природных аминокислот предоставляет возможность создания на их основе различных по строению амфифилов, подходящих для конкретной области применения [3].

Ранее нами был осуществлён синтез серии катионных бис-амфифилов на основе L-глутаминовой кислоты. Исследованы мембранообразующие свойства нового типа катионных димеров. Показано, что все бис-амфифилы образуют липосомы, устойчивые к

действию дестабилизирующих факторов (этанол, детергенты) [4]. Для соединений определены значения критических концентраций мицеллообразования (ККМ) и температуры фазовых переходов. Выявлено, что димерные структуры обладают более низкой ККМ, по сравнению с их мономерными аналогами. Установлено, что формируемые катионные липосомы образуют с ДНК различные по морфологии комплексы, способные эффективно проникать в клетку и обеспечивать экспрессию репортерных генов [5].

В данной работе, нами синтезирован ряд липидоподобных алифатических производных дипептидов, изучены их мембранообразующие свойства и выявлены взаимосвязи между структурой и свойствами.

Синтез соединений (XVI-XVII) осуществлялся по следующей схеме 1.

Реакцию между N-гидроксисукцинимидными эфирами соответствующих аминокислот и эфирами глутаминовой кислоты проводили по методу активированных эфиров [6] при небольшом избытке последних (соотношение реагентов 1:1.2 соответственно) в тетрагидрофуране в присутствии водного раствора KHCO_3 , необходимого для создания слабой щелочной среды. За ходом реакции наблюдали по данным ТСХ. Продукты реакции выделяли с помощью препаративной хроматографии на пластинках с силикагелем и колоночной хроматографии. Структуры полученных соединений подтверждались данными ИК- и ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Таблица 1. Значения критических концентраций везикуло- и мицеллообразования для соединений (XVI-XXII).

Формула	ККВ (ККМ), моль/л
(XVI) ArgGlu(C16) ₂	$9 \cdot 10^{-4}$
(XVII) OrnGlu(C16) ₂	$2,0 \cdot 10^{-4}$
(XVIII) LysGlu(C16) ₂	$7,5 \cdot 10^{-4}$
(XIX) OrnGlu(C8) ₂	$9 \cdot 10^{-4}$ ($1,0 \cdot 10^{-4}$)
(XX) OrnGlnC16	$(4,0 \cdot 10^{-5})$
(XXI) LysGlnC16	$(6,5 \cdot 10^{-5})$
(XXII) OrnGlu(5-OH)C16	$3 \cdot 10^{-4}$ ($8,5 \cdot 10^{-5}$)

Удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защиты осуществляли действием безводной трифторуксусной кислоты. В ¹H-ЯМР-спектре наблюдалось исчезновение сигналов протонов, соответствовавших защитным группам при сохранении содержательной части спектров оставшейся структуры. В зарегистрированном масс-спектре присутствовали пики молекулярных ионов соединений (XVI-XVII). Данные элементного анализа удовлетворительно соответствовали расчётным величинам. Короткоцепной катионный амфифил (XIX) и катионные амфифилы, содержащие в гидрофобном участке одну углеводородную цепь (XX-XXII) получали по аналогичной схеме.

Для образования α -гескадецилового эфира *L*-глутамина и α -гескадецил-*γ*-*трет*-бутил-*L*-глутамата реакция этерификации проводилась в течение 4 ч в

условиях азеотропной отгонки воды с толуолом. Этот метод характеризуется мягкими условиями и позволяет работать с термолабильными соединениями.

Изучены некоторые мембранообразующие свойства полученных амфифилов.

Критические концентрации везикулообразования

Был приготовлен ряд образцов с концентрациями амфифилов в воде от 10^{-2} до 10^{-5} моль/л и для каждого определена оптическая плотность. Полученные значения ККВ (ККМ) приведены в таблице 1.

Показано, что кривая зависимости оптической плотности от логарифма концентрации для соединений (XVI-XVIII, XX, XXI) имеет типичный вид с одной точкой перегиба, что характерно для поверхностно-активных соединений (рис. 1).

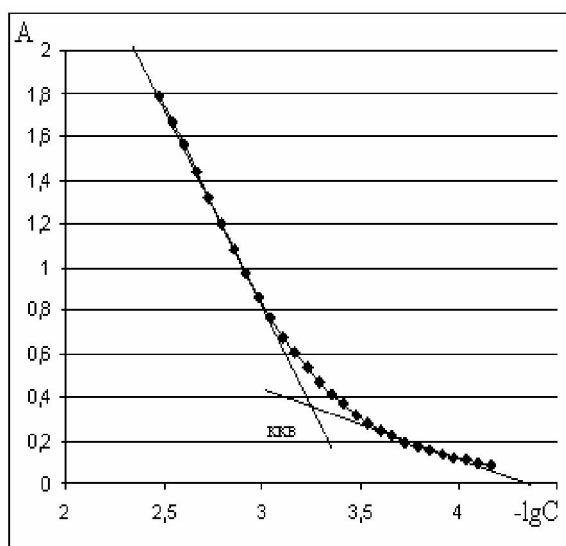


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от длины волны для соединения (XVIII).

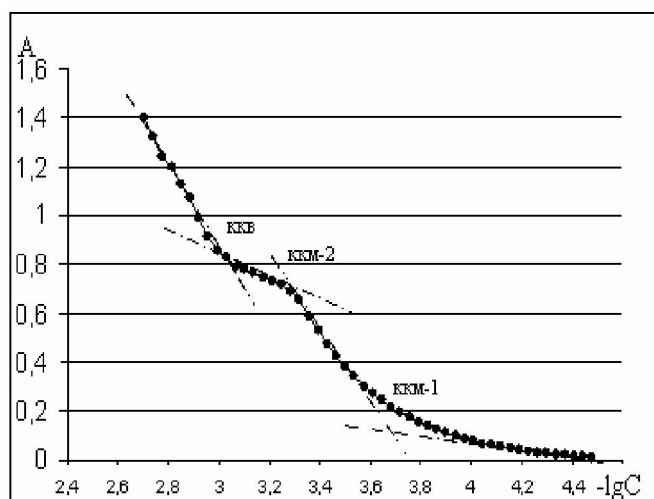


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от длины волны для соединения (XIX)

В отличие от соединений на основе дигексадецилового эфира, для соединения на основе диоктилового эфира наблюдается нетипичное для амфифилов поведение в водной среде. Кривая зависимости оптической плотности от длины волны для соединения (XIX) имеет три точки перегиба (рис. 2).

По литературным данным, это может быть связано с различными структурными переходами [7]:

- от дисперсии к мицеллам (ККМ-1),
- от обычных шарообразных мицелл к дисковым мицеллам, которые являются предшественниками бислойных агрегатов (ККМ-2),
- образование липосом (ККВ).

Графически такие переходы возможно изобразить следующим образом (рис. 3):

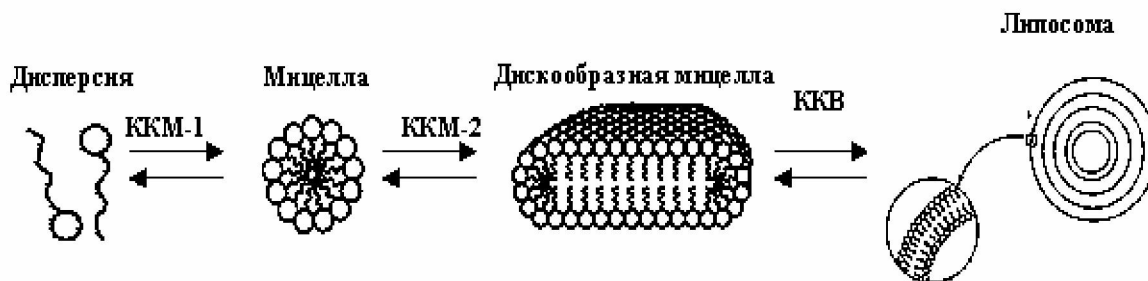


Рис. 3. Предполагаемые структурные переходы для соединения (XIX) [7].

Интересные результаты были получены для амфифила (XXII). Структура этого соединения способствует образованию, как внутренней соли, так и возникновению межмолекулярных ионных взаимодействий в водной среде. В литературе агрегаты, которые при этом могут образовываться, принято называть «луковичные чешуйки» – onions – (рис. 4) [8].

При этом переход от первичных мицелл к вторичным также характеризуется

дополнительным перегибом на графике зависимости оптической плотности от концентрации (рис. 5).

Для катионных амфифилов это впервые наблюдаемое явление.

Таким образом, показана возможность целенаправленного изменения морфологии агрегатов липопептидов на основе диоктилового и моногексадецилового эфиров *L*-глутаминовой кислоты в зависимости от концентрации в воде.

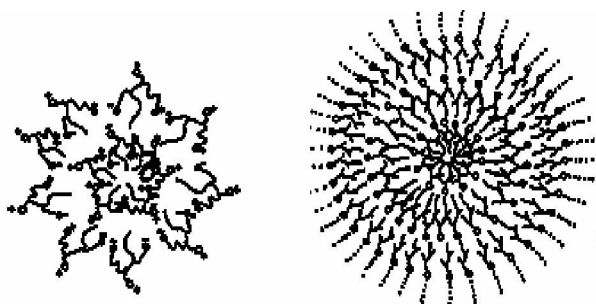


Рис. 4. Многослойные мицеллярные агрегаты.

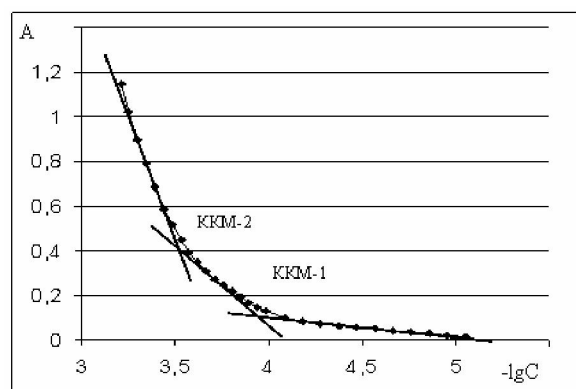


Рис. 5. Зависимость оптической плотности от концентрации для соединения (XXII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5-*трет*-бутиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты (Fluka, Швейцария) Вос-замещённые *N*-гидроксисукцинимидные эфиры *L*-аргинина, *L*-орнитина и *L*-лизина получены, согласно [10]; дигексадециловый и диоктиловый эфиры *L*-глутаминовой кислоты получены, согласно [11].

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе и $\text{DMCO-}d_6$ на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM – 400 (Германия) с рабочей частотой 400 МГц. Внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. ИК спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu IR – 435 (Япония). Измерение оптической плотности проводились на спектрофотометре Jas.co-7800 (Япония). Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 (Великобритания) методом MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола (DHG).

Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках Silufol (Чехословакия) в системах: хлороформ – метанол, 9 : 1; хлороформ – метанол – 30% аммиак, 5 : 3 : 1; толуол – хлороформ – метилэтилкетон – изопропанол, 10 : 6 : 3 : 1; хлороформ – метанол – уксусная кислота, 5 : 4 : 1; гексан – ацетон, 7 : 1. Вещества, содержащие амидные связи, обнаруживали обработкой парами хлора с последующим опрыскиванием 1%-ным раствором KI в воде. Препаративную тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле L 5/40 мкм (Чехословакия), колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле 45/80 мкм (Merck, Германия). Температуры плавления определяли на приборе Boetus (Германия) и не корректировали.

Для всех конечных соединений в масс-спектре зарегистрированы пики молекулярных ионов. Данные элементного анализа удовлетворительно соответствовали расчётным величинам.

Трис-*трет*-бутилоксикарбониларгинилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир (XV). К раствору Вос-Arg(Вос₂)-OSu 98 мг (0.17 ммоль) в 4мл ТГФ, добавляли 0.2 мл 10%-ного водного раствора гидрокарбоната калия и при перемешивании на магнитной мешалке порциями добавляли 110 мг (0.18 ммоль) Glu(C₁₆)₂ (XII). Смесь выдерживалась при комнатной температуре 5 ч. По окончании реакции растворитель удаляли в вакууме. Целевой продукт выделяли при помощи препаративной тонкослойной хроматографии в системе (В). Получали 52 мг (30 %) аморфного продукта Вос₃ArgGlu(C₁₆)₂, R_f (В) 0.71, $[\alpha]_D^{20} +19^\circ$ (с 0.1, C₂H₅OH). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl₃, δ , м. д.): 0.83 (т, 6H, 2CH₃); 1.0 (с, 2H, CH₂); 1.27 (с, 52H, CH₂); 1.45 (с, 9H, C(CH₃)₃); 1.5 (с, 18H, 2C(CH₃)₃); 1.6 (м, 4H, 2 β CH₂); 1.8-2.1 (м, 4H, 2 α CH₂); 2.28 (м, 2H, CH₂); 2.5 (т, 2H, CH₂COO); 3.8-4.2 (м, 2H, 2CH); 4.35 (т, 2H, CH₂); 5.6 (д, 1H, CONH). ИК-спектр (вазелиновое масло, ν_{max} , см⁻¹): 3500 (NH); 2910 (CH), 2902 (CH); 1740 (C=O); 1700 (C=O); 1630 (C=O, I амидная полоса); 1560 (NH, II амидная полоса); 1450 (CH); 1400 (CH); 1364 (CH); 1210; 1100 (C-O).

Аналогично получали **(Бис-*трет*-бутилоксикарбонил-орнитил)-глутаминовой кислоты дигексадециловый эфир (XIII)**

Аналогично получали **(бис-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизил)- глутаминовой кислоты дигексадециловый эфир (XIV).**

Аргинилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (XVI). Растворяли 25 мг (0.023 ммоль) Вос₃ArgGlu(C₁₆)₂ в 0.3 мл безводной трифторуксусной кислоты. Раствор выдерживали при комнатной температуре 6 ч. Кислоту отгоняли в вакууме до постоянного веса. Получали 20 мг (77 %) ArgGlu(C₁₆)₂ в

виде аморфного вещества, R_f (Г) 0.18, $[\alpha]_D^{20} + 14^\circ$ (c 0.1, C_2H_5OH). 1H -ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ , м. д.): 0.8 (т, 6H, $2CH_3$); 1.0 (с, 2H, CH_2); 1.6 (м, 4H, $2\beta CH_2$); 1.7-2.1 (м, 4H, $2\alpha CH_2$); 2.3 (м, 2H, CH_2); 4.0 (м, 2H, $2CH$); 4.35 (т, 2H, CH_2). ИК-спектр (в пленке, ν_{max} , cm^{-1}): 3500 (NH), 2909 (CH), 2900 (CH), 1740 (C=O), 1670 (C=O, I амидная полоса), 1664 (NH, II амидная полоса), 1470 (CH), 1450 (CHNC), 1252 (CF), 790, 700, 650. Найдено, %: C 55.91; H 9.30; N 7.24. $C_{44}H_{87}F_6N_5O_9$. Вычислено, %: C 55.97; H 9.29; N 7.42.

Аналогично получали **орнитилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (XVII)**.

Аналогично получали **лизилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (XVIII)**.

Орнитилглутаминовой кислоты диоктиловый эфир бистрифторацетат (XIX), орнитилглутамина гексадециловый эфир бистрифторацетат (XX), лизилглутамина гексадециловый эфир бистрифторацетат (XXI). орнитилглутаминовой кислоты 5-гексадециловый эфир трифторацетат (XXII) получали по аналогичной схеме.

Получение липосом

Раствор 10 мг липидов в 2 мл хлороформа медленно упаривали на ротаторном испарителе в круглодонной колбе. Остаток высушивали в вакууме 50 мин при $20^\circ C$. Затем прибавляли 2 мл дистиллированной воды и при нагревании до $70^\circ C$ встряхивали в течение 15 мин. Образовавшуюся дисперсию использовали в качестве мультиламеллярных липосом.

Определение критической концентрации везикулообразования

Оптическую плотность липидных дисперсий регистрировали в интервале концентраций $10^{-3} \div 10^{-6}$ М при длине волны 450 нм и температуре $18-20^\circ C$. Критическую концентрацию мицеллообразования определяли по точке перегиба зависимости $A_{450}/-lgC$.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 05-04-48544).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Narang A. S., Thoma L., Miller D. D., and Mahato R. I. Bioconjugate Chem. 2005, 16, 156.
2. Zelphati O., Wang V., Kitada S., Reed J.C., Felgner P.L., and Corbei J. J. Biol. Chem. 2001, 271, 37, 35103.
3. Valivety R., Jauregi P., Gill I. and Vulfson E. JAOCS, 1997, 74, 7, 879.
4. Жданов Р.И., Эль-Кадди А., Московцев А.А., Себякин Ю.Л., Ларин А.С., Муранов А.В., Хохлов А.Р. Доклады АН. 2004, 398, 118.
5. Полякова А.А., Панченкова И.А., Скрипникова М.А., Себякин Ю.Л. Биол. мемб. 2003, 20, 178.
6. Гринштейн Д., Виноц М., Химия аминокислот и пептидов Мир, 1965
7. Овчинников Ю.А., Биоорганическая химия. М.: «Просвещение», 1987, 556.
8. Jayakumar R., Murugesan M. Rafiuddin Ahmed M. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 1547.
9. Позднеев В. Ф. Биоорганическая химия. - 1986, 12, 1013.
10. Себякин Ю. Л., Федякова Н. Л., Рунова Е. А. Биоорганическая Химия. 1994, 20, 1101.

И.Н. Федулова
 аспирант,
Н.А. Брагина
 доцент,
А.Ф. Миронов
 заведующий кафедрой
 кафедры Химии и технологии
 биологически активных
 соединений
 им. Н.А. Преображенского
 МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СИНТЕЗ МЕЗО-АРИЛЗАМЕЩЕННЫХ ДИПИРРОЛИЛМЕТАНОВ С ДЛИННОЦЕПОЧНЫМИ ГИДРОФОБНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ С ЦЕЛЮ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНС-ЗАМЕЩЕННЫХ ПОРФИРИНОВ

УДК 547.979.7

Описан синтез мезо-арилзамещенных дипирролилметанов с длинноцепочечными гидрофобными заместителями, которые использовали для получения транс-замещенных тетрафенилпорфиринов. Данные липопорфирины будут изучены в составе модельных липидных мембран.

В настоящее время активно проводятся исследования по созданию супрамолекулярных комплексов и изучению межмолекулярных взаимодействий по типу “хозяин - гость”.

Структурный матрикс молекулы порфирина идеально подходит для использования в качестве матрицы при создании молекулы - “хозяина”, в которой размещены функциональные группы, отвечающие за взаимодействие с лигандом. Сопряженная 20-π-электронная система макроцикла порфирина служит удобным зондом для детектирования слабых межмолекулярных взаимодействий с молекулой “гостя” при помощи спектральных методов, среди которых успешно используются методы ЯМР, UV (в видимой области), КД, флуоресценции, ИК- и Рамановской спектроскопии [1]. Порфирины используют как модели гемовых белков, гемовых ферментов, ансамблей хлорофилла. Кроме того, предлагается использовать их в качестве сенсоров небольших органических субстратов: аминокислот, сахаридов, нуклеотидов, гормонов и феромонов; катионные порфирины образуют комплексы с фрагментами ДНК [1].

Как известно, в биологических системах порфирины функционируют в большинстве случаев только в составе сложноорганизованных мембранных ансамблей. В связи с этим представляет значительный интерес изучение процессов молекулярного узнавания на мембранном уровне.

Ранее были созданы липопорфириновые ансамбли для моделирования процессов переноса электронов и транспорта кислорода [2]. Для этого были синтезированы в том числе и тетраарилпорфирины, имеющие 4 или 8 остатков высших жирных кислот, стероидов и природных липидов, связанных с молекулой тетрафенилпорфиринов амидной связью [3]. Ковалентное присоединение остатков высших жирных кислот или спиртов к молекуле порфирина также возможно осуществить, исходя из ди-, тетра- и окта(оксифенил)производных тетрафенилпорфиринов, соответственно ацилированием хлорангидридами высших жирных кислот [4] или алкилированием алкилбромидом [5]. Методом получения оксифенилпорфиринов служит гидролиз метоксипроизводных тетрафенилпорфиринов, которые синтезируют конденсацией пиррола с соответствующими метоксибензальдегидами [6].

Целью настоящей работы является синтез транс-замещенных тетрафенилпорфиринов по методу с использованием дипирролилметанов, содержащих остатки природных высших жирных спиртов и кислот и их дальнейшее изучение в

составе модельных мембран. Метод на основе дипирролилметанов обладает целым рядом преимуществ, что объясняет возросший интерес к данному методу и его широкое использование [7].

Построение молекулы порфирина из мезо-замещенных дипирролилметанов и замещенных бензальдегидов позволяет получать симметричные структуры с требуемым набором заместителей. Кроме того, использование 2-х различных альдегидов при конденсации с дипирролилметаном дает возможность получить несимметричные порфирины

типа АВ₃ [8]. Существенными факторами являются простота получения исходных дипирролилметанов и достаточно высокие выходы (50-60%) порфиринов.

Нами были получены ранее не описанные в литературе мезо-арилдипирролилметаны (3) и (4), имеющие длинные гидрофобные заместители. Мезо-арилзамещенные дипирролилметаны (3) и (4) синтезировали с высокими выходами конденсацией замещенных бензальдегидов (1) и (2) с большим избытком пиррола, выступающего в роли реагента и растворителя по методу [9].

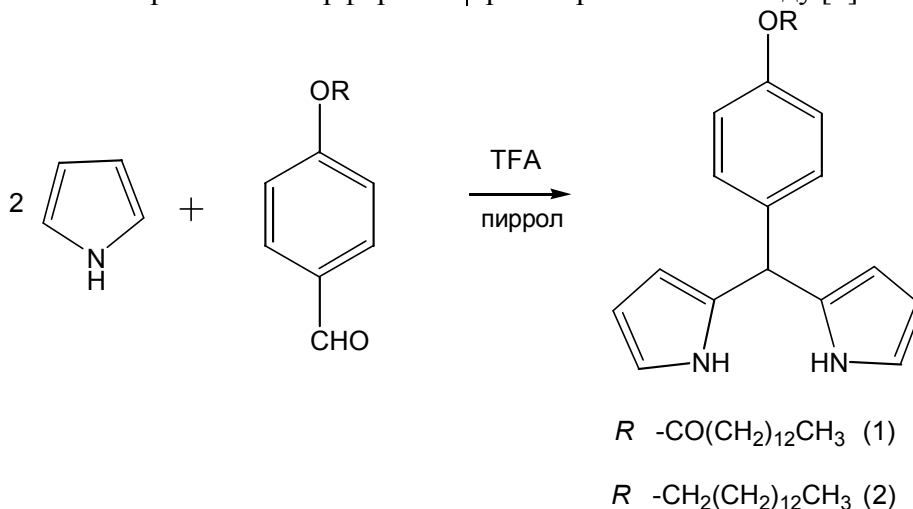


Рисунок 1.

Мезо-(4-тетрадецилоксифенил)дипирролилметан (3) получали конденсацией пиррола и бензальдегида (1) в соотношении 80:1 в присутствии каталитического количества ТФУК (рис.1). Многократный избыток пиррола, выступающего в роли реагента и растворителя, значительно снижает выход побочных олигомерных продуктов. Реакцию проводили в течение 30 мин при комнатной температуре в токе инертного газа. О завершении процесса конденсации судили по данным ТСХ. Реакционную массу разбавляли хлористым метиленом, встряхивали над 0,1 N NaOH и промывали водой до нейтральной реакции. Избыток пиррола удаляли в вакууме. Продукты реакции разделяли с помощью флэш-хроматографии на силикагеле. В систему растворителей добавляли 1% триэтиламина во избежание разрушения дипирролилметана (3) на силикагеле, имеющем слабокислый характер. После

отделения от побочных олигомерных продуктов дипирролилметан (3) кристаллизовали из этанола. Выход (3) составил 76 %.

Мезо-(4-тетрадеканоилоксифенил)дипирролилметан (4) получали аналогичным образом, конденсацией пиррола и 4-тетрадеканоилоксибензальдегида (2) (рис 1). Обработку реакционной массы в данном случае нельзя проводить в сильнощелочной среде из-за возможного гидролиза сложноэфирной связи, использовали слабый раствор гидрата аммиака. Выход (4) составил 55%.

Замещенные бензальдегиды (1) и (2) получали из *n*-гидроксибензальдегида соответственно путем алкилирования тетрадецилбромидом и ацилирования хлорангидридом миристиновой кислоты. Полученные дипирролилметаны (3) и (4) были использованы нами для синтеза мезо-арилзамещенных тетрафенилпорфиринов (5) и (6).

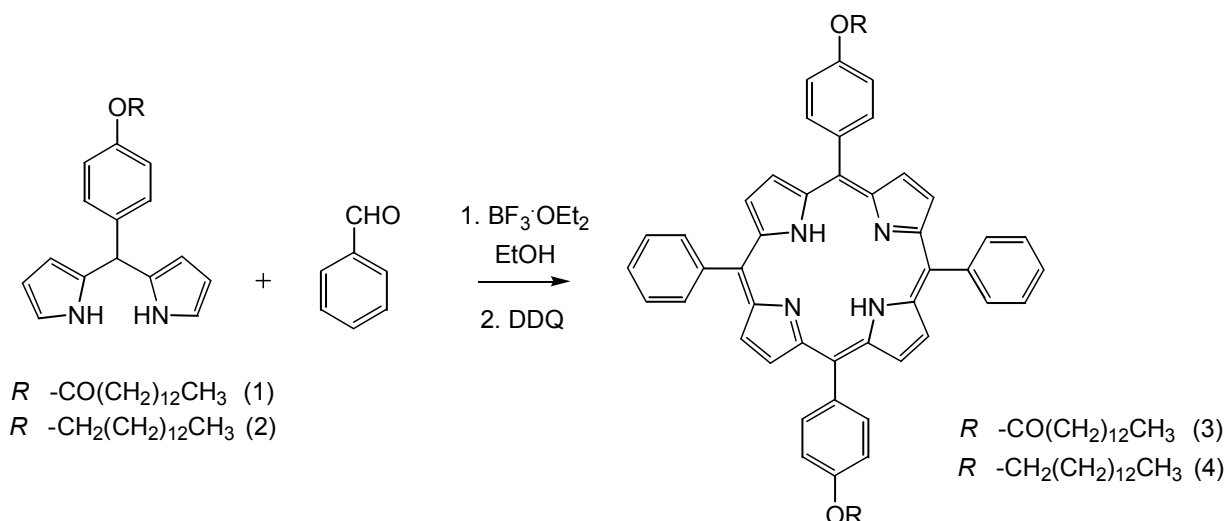


Рисунок 2.

Порфирины (5) и (6) получали конденсацией соответствующих мезо-арилзамещенных дипирролилметанов (3) и (4) с бензальдегидом в присутствии кислотного катализатора – эфира трехфтористого бора, с последующим окислением образующегося порфириногена до порфирина под действием производных бензохинона (рис 2). Очистку целевых порфиринов (3) и (4) осуществляли методом колоночной хроматографии на силикагеле. Выход 5,15-бис(4-тетрадецилоксифенил)-10,20-дифенилпорфина (5) составил 50%, 5,15-бис(4-тетрадеканилоксифенил)-10,20-дифенилпорфина (6) - 38%.

Структура и индивидуальность полученных соединений была подтверждена данными ТСХ, ИК-, УФ- и ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Синтезированные порфирины с длинноцепочечными заместителями (5) и (6) обладают высокой растворимостью в органических растворителях. Наличие в порфиринах остатков природных высших жирных кислот и спиртов позволит включать эти соединения в модельные фосфолипидные мембраны без нарушения их целостности и создавать супрамолекулярные ансамбли на мембранном уровне.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Maiya G.B. New porphyrin architectures and host-guest chemistry.// J. Porphyrins Phtalocyanines. 2004. V. 8. P. 1118-1128.
2. Пикуз С.С., Себякин Ю.Л. Модельные системы на основе липид-порфириновых ансамблей и липопорфиринов в биохимических исследованиях.// Биоорг. химия. 1996. т. 22. № 10-11. С. 725-736.
3. Groves J.T., Neumann R. Regioselective oxidation catalysis in synthetic phospholipid vesicles. Membrane-spanning steroidal metalloporphyrins.// J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 2900 - 2909.
4. Tsuchida E., Hasegawa E., Komatsu T., Nakata T., Nishide H. Synthesis and haracterization of a membrane-spanning porphirinatoiron (II).// Chem. Lett. 1990. P. 389-392.
5. Семейкин А.С., Сырбу С.А., Койфман О.И. Мезо-фенилзамещенные порфирины, модификация в арильных группах. // Изв. ВУЗов (Х и ХТ). 2004. Т. 47. № 5. С. 46-55.
6. Сырбу С.А., Семейкин А.С. Синтез (гидроксифенил)порфиринов.// Ж. Орг. Хим. 1999. Т. 35. № 10. С. 1262-1265.
7. Rao P.D., Dhanalekshmi S., Littler B.J., Lindsey J.S.. Rational synthesis of porphyrins.// J. Org. Chem. 2000. V. 65. № 22. P. 7323 - 7344.
8. Caminos D, Durantini E. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents.// J. Porphyrins Phtalocyanines. 2005. V. 9. P. 334-337.
9. Littler B.J., Miller M.A., Hung C-H., Wagner R.W., Lindsey J.S.// J. Org. Chem. 1999. V.64. P. 1391-1396.

А.В. Коваль
студент группы ХТ-409
М.К. Захаров
профессор кафедры ПАХТ
Г.А. Носов
заведующий кафедрой ПАХТ
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

СПОСОБЫ ЭНЕРГОСБЕРЕЖЕНИЯ ПРИ ВЫПАРИВАНИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

УДК: 66.021

Предложен и проанализирован новый способ экономии греющего пара в многокорпусных выпарных установках за счет возвращения части теплоты конденсата после его дросселирования. Проведено сопоставление этого варианта энергосбережения при выпаривании растворов с уже известными.

На химических производствах часто получают концентрированные растворы из разбавленных, иногда - чистый растворитель (например, при опреснении морской воды). В применяемых для этих целей установках могут использоваться самые различные источники теплоты: топочные газы, электроэнергия, различного рода высокотемпературные теплоносители (масла или специально синтезированные органические соединения, позволяющие работать при температурах до 300°C) и другие. Но самым распространенным греющим агентом на производствах является сухой насыщенный водяной пар из-за его доступности и относительной экологической безвредности получающегося конденсата (не считая теплового загрязнения).

Процесс выпаривания характеризуется повышенными энергозатратами, поскольку на удаление 1 кг воды из раствора расходуется более 1 кг свежего пара.

Энергоемкость выпарной установки можно уменьшить за счет использования вторичного пара для выпаривания того же раствора. Для этого нужно решить проблему, связанную с тем, что температура получившегося вторичного пара меньше температуры кипения раствора вследствие температурной депрессии. Для создания необходимой движущей силы процесса теплопередачи применяются 2 способа [1]:

- повышение температуры конденсации пара.
- понижение температуры кипения раствора.

Первый способ реализуется при использовании различных тепловых насосов (ТН). Принцип действия таких насосов заключается в повышении параметров вторичного пара до значений греющего. Это можно сделать различными способами, например сжатием вторичного пара в компрессоре или смешением его с острым паром в инжекторе. Такие насосы называются соответственно полным и частичным - по количеству возвращаемого в установку вторичного пара. Схемы таких установок приведены на рис. 1.

Частичный тепловой насос использует лишь часть вторичного пара, которая определяется коэффициентом инжекции. Он экономит меньше свежего пара, чем полный, однако позволяет отводить экстра-пар. Если последний находит применение, то он может быть выгоднее полного, поскольку не требует затрат дорогостоящей электроэнергии на компрессор. Если же нет потребителя на вторичный пар, то разумнее использовать полный тепловой насос. В этом случае теплота вторичного пара используется полнее, и, как показано в [2], в этом случае можно достичь экономии до 43% затрат.

Однако, для этих двух насосов все еще требуется подвод дополнительного пара D_+ или D_0 . Кроме того, после сжатия вторичного пара получается перегретый пар, который перед конденсацией должен отдать теплоту перегрева, а для этого требуется существенно увеличить поверхность теплообмена греющей камеры.

Чтобы избавиться от этих недостатков, применяется усовершенствованный тепловой насос [3]. В усовершенствованном тепловом насосе для компенсации дополнительного потока пара используется дросселирование конденсата греющего пара до давления вторичного, что позволяет получать влажный пар и, после разделения на воду и сухой насыщенный пар, возвращать последний в установку.

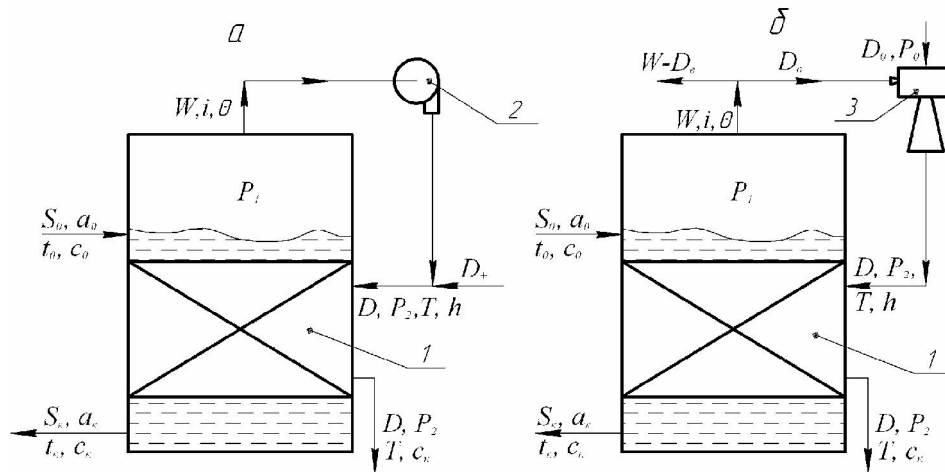


Рис. 1. Схема работы выпарных аппаратов с тепловым насосом: а – полный ТН, б – частичный ТН

1 – выпарной аппарат, 2 – турбокомпрессор, 3 – инжектор

Рис. 1. Схема работы выпарных аппаратов с тепловым насосом: а – полный ТН, б – частичный ТН (1 – выпарной аппарат, 2 – турбокомпрессор, 3 – инжектор)

Кроме того, для получения сухого насыщенного пара используется барботирование сжатого в компрессоре пара через конденсат греющего, в результате получается поток пара D'' , который, как показано в [3], может быть даже больше необходимого потока D . В этом случае возможен отвод из установки экстра-пара.

Схема усовершенствованного теплового насоса позволяет использовать не только теплоту вторичного пара, но и частично возвращать в установку теплоту конденсата. Примечательно, что в такой схеме процесса не требуется подвода греющего пара, то есть установка работает только с затратами электроэнергии на сжатие пара.

Как уже было упомянуто, второй способ использования вторичного пара в качестве греющего заключается в понижении температуры кипения раствора во втором корпусе за счет уменьшения давления в нем. Поэтому часто второй корпус работает под вакуумом, для создания которого необходим барометрический конденсатор смешения.

Теплота конденсации получающегося вторичного пара примерно равна теплоте конденсации греющего пара, поэтому в двух корпусах можно выпарить в 2 раза больше растворителя по сравнению с однокорпусной. Еще более выгодным является использование трехкорпусной выпарной установки

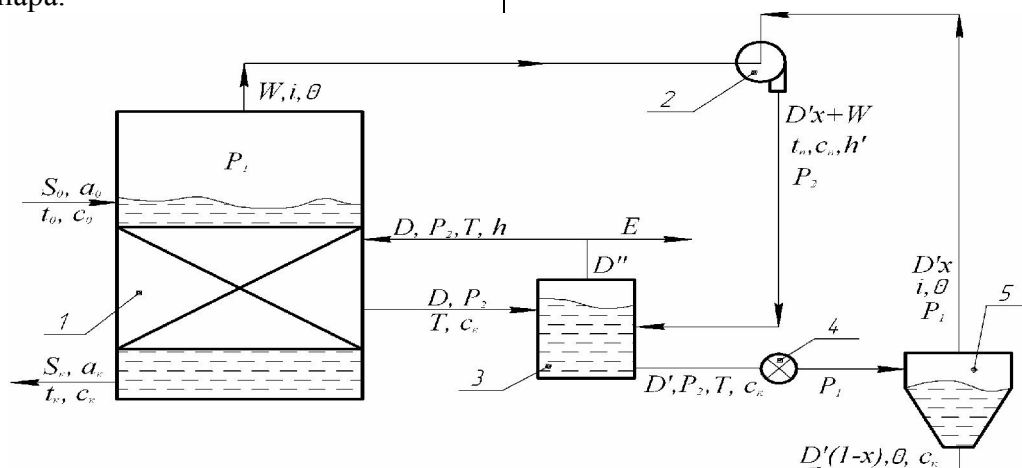


Рис. 2. Схема работы выпарного аппарата с усовершенствованным тепловым насосом

1 – выпарной аппарат, 2 – турбокомпрессор, 3 – сепаратор высокого давления,

4 – дроссель, 5 – сепаратор низкого давления

Рис. 2. Схема работы выпарного аппарата с усовершенствованным тепловым насосом.

(1 – выпарной аппарат, 2 – турбокомпрессор, 3 – сепаратор высокого давления, 4 – дроссель, 5 – сепаратор низкого давления)

Данный способ очень эффективен, поскольку при высокой экономии (2 корпуса позволяют экономить почти 50% пара) обеспечивает простоту эксплуатации установки. Применение полного теплового насоса имеет ограниченное применение из-за использования турбокомпрессора, имеющего малые степени сжатия при больших объемных расходах пара. Поэтому его выгодно использовать при соотношении

давлений $P_2/P_1 \approx 2,5$ и при производительности по вторичному пару более $1,5 \text{ м}^3/\text{с}$ [1].

Многокорпусную установку можно усовершенствовать путем упомянутого ранее процесса дросселирования конденсата греющего пара до давления вторичного пара и затем добавлением образующегося при дросселировании потока пара ко вторичному.

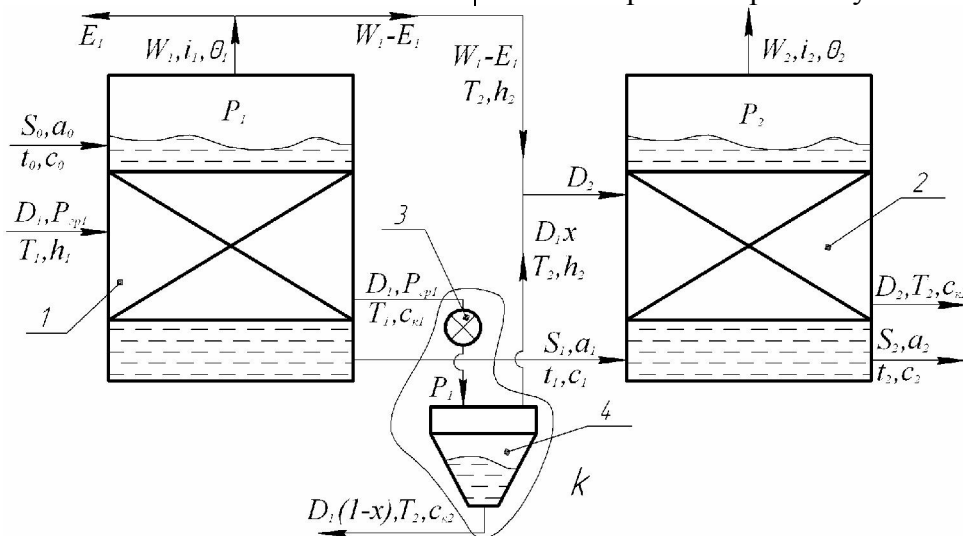


Рис. 3. Схема работы усовершенствованного двухкорпусного выпарного аппарата

1 – первый корпус, 2 – второй корпус, 3 – дроссель, 4 – сепаратор

Рис. 3. Схема работы усовершенствованного двухкорпусного выпарного аппарата (1 – первый корпус, 2 – второй корпус, 3 – дроссель, 4 – сепаратор)

Схема такой установки представлена на рис. 3: конденсат под давлением $P_{зр1}$ атм температурой T_1 °C проходит через дроссель 3 и превращается во влажный пар с давлением P_1 атм и температурой T_2 °C, после чего поступает в сепаратор 4, где разделяется на сухой насыщенный пар и конденсат. Пар затем используется в качестве дополнительного греющего пара во втором корпусе. Заметим, что конденсат имеет достаточно высокую температуру, и его можно использовать для подогрева исходного раствора.

В данной схеме часть теплоты в виде водяного пара возвращается в установку и позволяет получить дополнительную экономию греющего пара. Количество дополнительного пара определяется как произведение общего количества греющего пара (конденсата) на степень сухости x полученного влажного пара. Для определения этого параметра составим тепловой баланс по тепловым потокам по

контур k , охватывающему дроссель и сепаратор.

$$D_1 T_1 c_{k1} - D_1 (1-x) T_2 c_{k2} - D_1 x \cdot h_2 = 0,$$

$$\text{откуда } x = \frac{T_1 c_{k1} - T_2 c_{k2}}{h_2 - T_2 c_{k2}}.$$

При расчете выпарной установки необходимо также составить тепловые балансы по корпусам. Для первого корпуса он будет таким же, как и для установки без дросселирования:

$$Q_1 = D_1 (h_1 - T_1 c_{k1}) = S_1 c_1 t_1 - S_0 c_0 t_0 + W_1 i_1$$

Для второго корпуса добавится теплота дополнительного потока пара: $Q_2 = (W_1 - E_1 + D_1 x)(h_2 - T_2 c_{k2}) = S_2 c_2 t_2 - S_1 c_1 t_1 + W_2 i_2$. Как и при расчете выпарной установки без дросселирования выражения $S_1 c_1$ и $S_2 c_2$ можно заменить по правилу аддитивности теплоемкости, например:

$$S_2 c_2 = S_0 c_0 - W_1 c_p - W_2 c_p.$$

Тогда получается:

$$Q_1 = D_1(h_1 - T_1 c_{k1}) = S_0 c_0(t_1 - t_0) + W_1(i_1 - c_P \cdot t_1) \quad (1)$$

$$Q_2 = (W_1 - E_1 + D_1 x)(h_2 - T_2 c_{k2}) = S_0 c_0(t_2 - t_1) - W_1 c_P(t_2 - t_1) + W_2(i_2 - c_P t_2) \quad (2)$$

При известной степени сухости пара система уравнений (1) и (2) с двумя неизвестными W_1 и D_1 легко решается. Однако, расчет такой установки осложнен невозможностью определения величины x , поскольку первоначально неизвестны параметры ведения процесса и поэтому лишь после вычисления площади поверхности теплообмена и уточнения движущих сил по корпусам возможно рассчитать величину x .

Процесс расчета выпарной установки является достаточно трудоемким из-за поиска справочных данных и использования громоздких формул. Современные программы позволяют автоматизировать эти процессы. В наших расчетах использовалась программа Microsoft Excel, где помимо основного файла, содержащего результаты и формулы для расчетов, использовался дополнительный – с таблицами справочных данных (параметров растворов, воды и водяного пара), откуда автоматически выбирались необходимые величины и соответствующая подпрограмма делала интерполяцию. Это позволило выполнить

расчет выпарных установок для 5 видов солей с конечной концентрацией до 50%, контролировать все стадии расчета и сравнить показатели работы усовершенствованной установки с обычной.

Ниже приведены результаты расчета для конкретной задачи – выпаривания раствора гидроксида натрия производительностью $S_0 = 9000 \text{ кг/ч}$ от начальной концентрации $a_0 = 8\% \text{ масс.}$ до конечной $a_2 = 34\% \text{ масс.}$ Для обычной установки расход пара составил 4340 кг/ч и 4130 кг/ч для усовершенствованной, то есть экономия равна 210 кг/ч, что составляет 5% от исходного количества греющего пара. Несмотря на казалось бы небольшую цифру, это довольно хороший результат: дроссель и сепаратор, единожды установленные, не создают дополнительных эксплуатационных затрат и окупают себя достаточно быстро. Также следует отметить, что степень сухости составляет 9,3%, то есть почти десять процентов конденсата возвращаются в установку в виде пара.

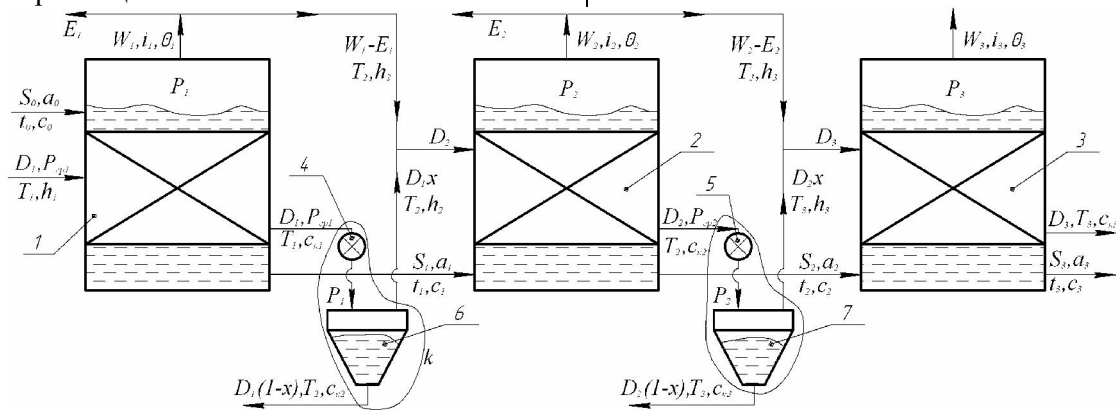


Рис. 4. Схема работы усовершенствованного трехкорпусного выпарного аппарата
1,2,3 – корпуса установки, 4,5 – дроссели, 6,7 – сепараторы

Рис. 4. Схема работы усовершенствованного трехкорпусного выпарного аппарата
1,2,3 – корпуса установки, 4,5 – дроссели, 6,7 – сепараторы

Аналогичная схема для трехкорпусной выпарной установки представлена на рис.4. В этом случае дросселирование можно сделать как для конденсата греющего пара в первом корпусе, так и во втором. Балансы для трехкорпусной установки и схема расчета аналогичны двухкорпусной.

Степень сухости получаемого после дросселирования влажного пара получается из тепловых балансов по сепаратору и дросселю:

Для первого корпуса:
 $D_1 T_1 c_{k1} - D_1 (1-x) T_2 c_{k2} - D_1 x \cdot h_2 = 0,$

$$\text{откуда } x_1 = \frac{T_1 c_{k1} - T_2 c_{k2}}{h_2 - T_2 c_{k2}}$$

Для второго корпуса: $(D_2 \cdot T_2 c_{k2} - D_2(1 - x_2)T_3 c_{k3} - D_2 x_2 \cdot h_3 = 0$, откуда

$$x_2 = \frac{T_2 c_{k2} - T_3 c_{k3}}{h_3 - T_3 c_{k3}}$$

Тепловые нагрузки по корпусам:

$$Q_1 = D_1(h_1 - T_1 c_{k1}) = S_0 c_0(t_1 - t_0) + W_1(i_1 - c_p \cdot t_1)$$

$$Q_2 = (W_1 - E_1 + D_1 x_1)(h_2 - T_2 c_{k2}) = S_0 c_0(t_2 - t_1) - W_1 c_p(t_2 - t_1) + W_2(i_2 - c_p t_2)$$

$$Q_3 = (W_2 - E_2 + D_2 x_2)(h_2 - T_2 c_{k2}) = S_0 c_0(t_3 - t_2) - (W_1 + W_2)c_p(t_3 - t_2) + W_3(i_3 - c_p t_3)$$

Очевидно, что здесь имеется система 3-х уравнений с 3-мя неизвестными (D_1, W_1, W_2), поскольку $D_2 = D_1 \cdot x_1 + W_1 - E_1$ и $W_3 = W - (W_1 + W_2)$. Проблема с неизвестными x_1 и x_2 здесь также решается итерационным методом.

Расчет обычной трехкорпусной установки дает расход греющего пара 3270 кг/ч, а для аппарата с дросселированием 3090 кг/ч, то есть экономится 180 кг/ч греющего пара, или 5,5%.

На предприятиях одним из часто используемых способов уменьшения суммарного расхода пара в цехе, на заводе является отвод экстра-пара с выпарной установки. Как известно, вторичный пар имеет более низкое давление, однако вполне может использоваться в качестве греющего в других технологических процессах, где требуется пар меньшего давления. Например, для нагревания воды до определенной температуры зачастую используют греющий пар, и разумно

использовать не пар высокого давления из центрального паропровода, а экстра-пар из выпарной установки. Это выгодно, поскольку стоимость пара в интервале 2,5-15 атм. обычно различается не более, чем на 8-10%, а на многих предприятиях даже одинакова. Кроме того, это приводит к уменьшению потока пара, идущего в барометрический конденсатор смешения и снижает затраты энергии на создание вакуума.

Рассмотрим, как влияет применение дросселирования на работу установок с отводом экстра пара. Но сначала проанализируем, как зависит расход греющего пара от количества отводимого экстра-пара. Результаты расчетов приведены на рис. 5. Для двухкорпусной установки зависимость D_1 от E имеет вид прямой линии, тангенс угла наклона которой составляет 0,497. На каждый дополнительный килограмм получаемого экстра-пара расходуется всего 0,5 кг свежего пара. Для разных видов солей и различных концентраций раствора такая зависимость сохраняется.

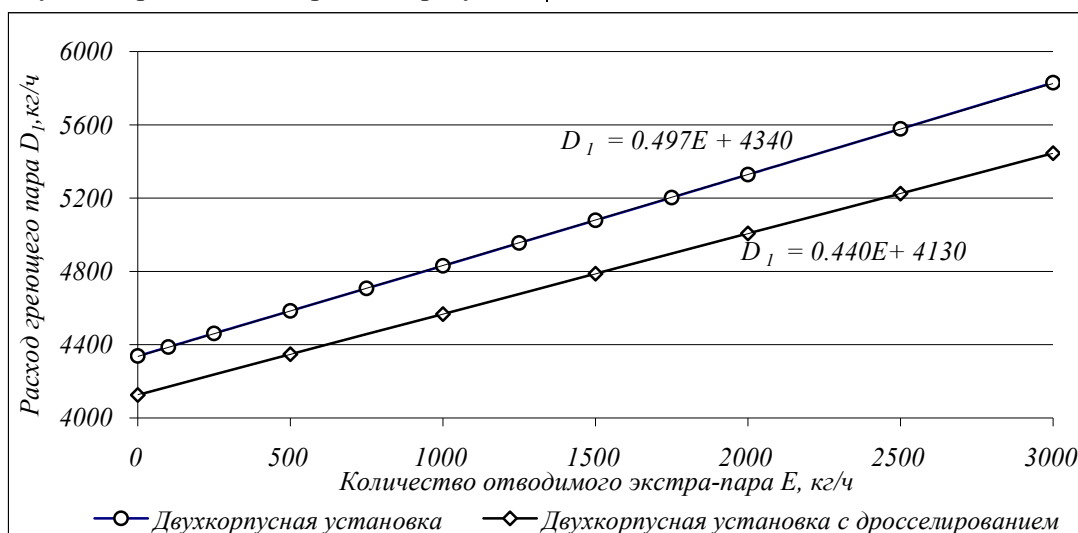


Рис. 5. Зависимость расхода греющего пара от количества отводимого экстра-пара в двухкорпусной установке.

Объясняется это следующим. Представим, что в двухкорпусную установку необходимо удалить 4 кг пара из раствора, чтобы получить заданную концентрацию. Считая постоянными теплоты конденсации водяного пара в рабочем интервале давлений, в первый корпус для этого необходимо подать 2 кг греющего пара: в первом корпусе он испарит 2 кг вторичного пара из раствора, а во втором эти 2 килограмма вторичного пара в качестве греющего пойдут на выпаривание еще двух килограммов воды. Теперь предположим, что из установки можно отвести некоторое количество экстра-пара. Для этого, очевидно, надо увеличить расход греющего. Предположим, мы добавили дополнительный килограмм острого пара. Теперь в первый корпус подается 3 кг пара, которые выпаривают столько же килограммов воды. Теперь во втором корпусе надо удалить только 1 килограмм воды, израсходовав на это 1 кг вторичного пара. А поскольку поток из первого корпуса

– 3 кг, то получившиеся таким образом 2 «лишних» килограмма мы и отводим в качестве экстра-пара.

Следовательно, и линия зависимости расхода греющего пара от количества отводимого экстра-пара должна иметь тангенс угла наклона $\frac{1}{2}$, что и подтверждается расчетами. Небольшое отклонение можно объясняется изменением теплоты конденсации с температурой.

Аналогичное рассуждение приводит к тому, что в трехкорпусной установке тангенс угла наклона линии должен составить $1/1,5$ или $2/3$, поскольку в ней на испаренный «лишний» килограмм вторичного пара из первого корпуса в остальных двух корпусах очевидно экономится только 0,5 кг пара (которые нужны были бы для испарения этого килограмма) и суммарно на 1 кг дополнительного острого пара можно отвести только 1,5 кг экстра-пара. Это также соответствует полученной зависимости.

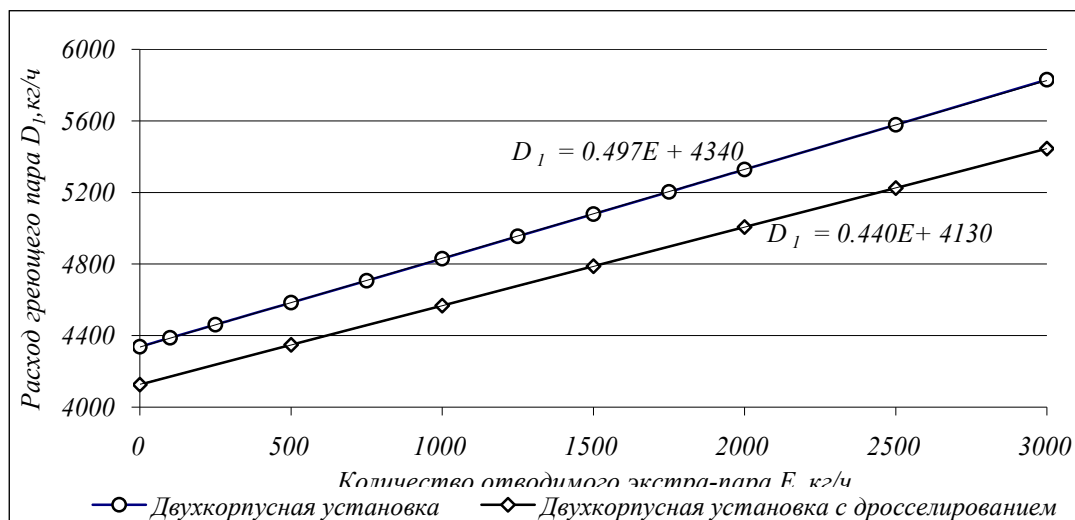


Рис. 6. Зависимость расхода греющего пара от количества отводимого экстра-пара в трехкорпусной установке.

Главным ограничением при таком способе экономии является упомянутое выше ухудшение характеристик отводимого пара. Достаточно сложно найти применение пару с давлением 1,2 атмосферы, а пар ниже 1 атм не используется, поскольку имеет низкую температуру конденсации и, следовательно, малую движущую силу теплопередачи. Данные графики оканчиваются значением $E = 3000$ кг/ч отводимого экстра-пара, поскольку в окрестностях этого значения для большинства установок давление

отводимого пара становится неприемлемо низким – менее 1 атм.

Итак, при увеличении количества отводимого экстра-пара увеличивается и расход греющего пара. Таким образом становится еще более привлекательной идея дросселирования конденсата, поскольку при увеличении его потока будет получаться все большее количество дополнительного пара. Это позволяет предположить для усовершенствованной установки более пологую зависимость D_1 от E и большую экономию греющего пара.

Расчет, естественно, подтвердил это. Так, при отводе 3000 кг/ч экстра-пара экономия составляет уже 6,6% греющего пара. Еще более выгодным представляется использование дросселирования в трехкорпусной установке (для 3000 кг/ч экономия составляет 8,2% пара). Примечательно, что при этом пар имеет достаточно высокие параметры. Это оптимальный вариант установки, поскольку при высоком качестве отводимого пара достигаются хорошие экономические показатели. Объясняется это тем, что при возрастании количества греющего пара, возрастает и поток возвращаемого в установку пара из сепараторов, особенно из первого корпуса, который затем «отрабатывает» в двух корпусах, давая соответственно двойную выгоду.

В случае трехкорпусной установки можно предложить несколько вариантов отвода экстра-пара. И если для первого корпуса тангенс угла наклона линии $D_1 = f(E)$ больше, чем у двухкорпусной, то при отводе из второго корпуса он должен быть меньше и очевидно равняться 1/3. Для аппарата с применением дросселя он получился еще меньше (однако экономия получается очень маленькой, соответствующая небольшому увеличению потока острого пара) и при этом получается пар низкого качества. Можно попытаться совместить достоинства обоих способов отвода с помощью инжектора – в этом случае часть пара высокого давления отводится из первого корпуса, часть с низким давлением из второго а затем они смешиваются в инжекторе.

Основные обозначения:

- D - массовый расход греющего пара, кг/с или кг/ч
- x - степень сухости пара, кг сухого насыщ.пара/кг вл. пара.
- T - температура конденсации греющего пара, °C
- c - теплоемкость жидкостей, кДж/(кг·K)
- h - энтальпия паров, кДж/кг
- S - массовый расход раствора, кг/с или кг/ч
- t - температура раствора, °C
- W - массовый расход вторичного пара кг/с или кг/ч
- E - массовый расход экстра-пара кг/с или кг/ч
- Q - тепловая нагрузка в корпусе, кВт
- a - концентрация, %масс.
- P - давление в корпусе, атм или бар.

Индексы.

- гр – греющего пара
- к – конденсата
- +
- дополнительный поток пара

ЛИТЕРАТУРА:

1. Айнштейн В.Г., Захаров М.К., Носов Г.А., и др. Общий курс процессов и аппаратов химической технологии.// М.Химия, 1999 – 1 кн 888с, 2000 – 2 кн. 1760с.
2. Айнштейн В.Г., Захаров М.К., Носов Г.А. Компенсирующий тепловой насос в химико-технологических процессах (возможности и основы расчета). Хим. Пром, 2000, №9, с. 454-462
3. Захаров М.К. Сравнение эффективности применения различных вариантов теплового насоса. Хим. Пром, 2002 №8 с. 10-16

А.Н. Кочетов
аспирант,
Л.Ю. Аликберова
профессор,
Е.В. Савинкина
доцент,
В.В. Кравченко
старший научный сотрудник
кафедра Неорганической химии,
МИТХТ им М.В. Ломоносова

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ МОДИФИКАЦИЙ 2- (ДИФЕНИЛАЦЕТИЛ)ИНДАНДИОНА-1,3

УДК 543.8:543.432

Методом ИК-спектроскопии исследованы две полиморфные модификации антикоагулянта крови непрямого действия 2-(дифенилацетил)индандиона-1,3. Разница между модификациями скорее всего обусловлена различиями в упаковке молекул.

2-(Дифенилацетил)индандион-1,3 занимает особое место в ряду 2-ацилиндандионов-1,3 являясь, наряду с другими представителями этой серии, мощным антикоагулянтом крови [1] непрямого действия. Попадая в кровь, данные соединения конкурентно ингибируют редуктазу витамина К, чем тормозят активирование последнего в организме и прекращают синтез К-витаминзависимых плазменных факторов гемостаза – II, VII, IX, X [2].

В литературе приводятся данные о наличии большого числа полиморфных

модификаций для лекарственных средств [3], в том числе и для антикоагулянтов крови [4,5].

В работе [6] показано, что 2-(дифенилацетил)индандион-1,3 имеет по крайней мере две полиморфные модификации, однако детальное их исследование не проводилось. Между тем полиморфизм лекарственных средств вызывает большой исследовательский интерес, поскольку известно, что полиморфные модификации для ряда фармацевтических препаратов обладают различными биофармацевтическими и фармакотерапевтическими свойствами [7,8].

Изучению строения 2-ацилиндандионов-1,3 было уделено довольно много внимания в связи с возможными таутомерными превращениями трех конфигураций, обусловленными кето-енольной таутомерией (рис. 1).

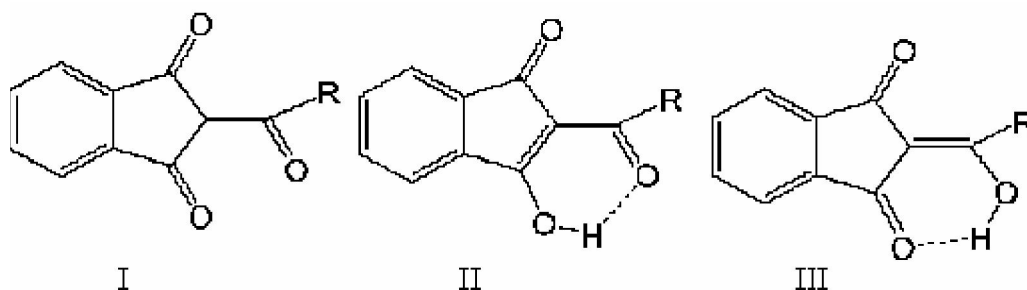


Рис. 1. Таутомерные формы 2-ацилпроизводных индандиона-1,3.

Биологические свойства производных 1,3-индандиона принято связывать с внутримолекулярным переносом заряда, что находит отражение, как на геометрических так и на спектральных характеристиках [9]. Ранние исследования

описывали соединения данного класса формами II и III. Однако впоследствии на основании данных ИК и ЯМР ^1H исследований [10] и квантовохимического моделирования пути внутримолекулярного переноса протона [11], было установлено

существование как в конденсированной фазе, так и в растворах таутомерной формы III. При этом увеличение объема ацильного заместителя приводит лишь к частичному выравниванию π -электронной плотности в циклической системе енола III без изменения типа связывания [12].

Спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C и ^{17}O изотопозамещенных 2-ацилиндандионов-1,3 подтвердила образование структуры III, стабилизированной антисимметричной внутримолекулярной водородной связью, ослабевающей для дейтероаналогов [11,12], в отличие от 2-(α -гидроксibenзилиден)-1-инданон-3-тиона, являющимся тиааналогом 2-бензоилиндандиона-1,3, которому была приписана форма II [13].

Различие между 2-дифенилацетил- и 2-ацетил-, 2-триметилацетилпроизводными по данным РСА заключается в значительно большем смещении плоскостей псевдодициклической индандионатной системы почти до стопочной формы для первого соединения [13,15]. Подобное расположение было зафиксировано и для 2-(циннамоил)индандиона-1,3 и объяснялось, в первую очередь, образованием КПЗ, обусловленному наличием гетероатома в ацильном фрагменте [16]. Однако? По результатам наших исследований, для 2-

(дифенилацетил)индандиона-1,3 подобное расположение молекул в димере можно объяснить лишь более выгодной упаковкой, обеспечивающей, по-видимому, наименьшее разупорядочивание объемного дифенилацетильного заместителя, а не наличием гетероатома. Проведенные нами квантовохимические вычисления полуэмпирическими методами подтвердили отсутствие переноса заряда в димере для последнего соединения.

Мы провели ИК-спектроскопическое изучение полиморфных модификаций 2-(дифенилацетил)индандиона-1,3 с использованием ИК-Фурье спектрометра Bruker EQUINOX 55 в виде таблеток KBr в диапазоне от 4000 до 400 cm^{-1} при комнатной температуре. Модификации были получены при кристаллизации из этанола (модификация Б) или смеси этанола и хлороформа (модификация А) 2-(дифенилацетил)индандиона-1,3 98 % (ТУ 9392-001-47627203-00) производства ООО «Витамин +» (Россия).

Максимальные отличия в спектре наблюдаются в области 1710-1460 cm^{-1} , наиболее характеристичной для валентных колебаний $\nu(\text{C-O})$ карбонильных групп (рис. 2); значения приведены в таблице 1.

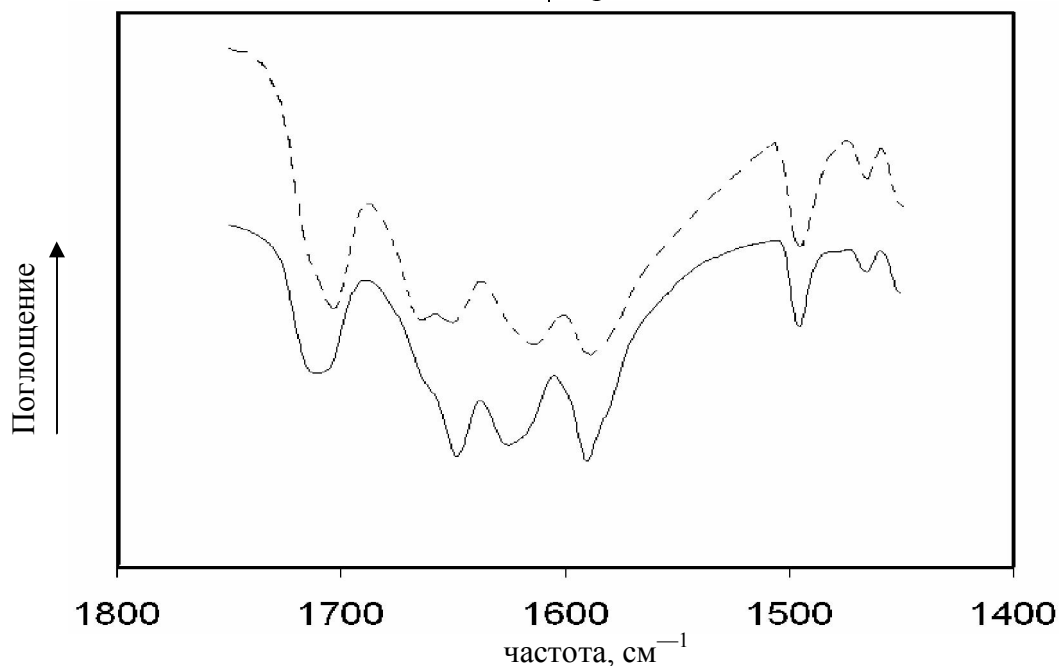


Рис. 2. ИК-спектры полиморфных модификаций 2-(дифенилацетил)индандиона-1,3

————— Модификация Б
 - - - - - Модификация А

Таблица 1. Наблюдаемые полосы на ИК-спектрах полиморфных модификаций 2-(дифенилацетил)индандиона-1,3 (см⁻¹)

Модификация А	Модификация Б
1703	1710
1664 1651	1648
1614	1626
1589	1590
1495	1496
1466	1466

Полученные данные свидетельствуют об образовании двух различных полиморфных форм изученного соединения. Проведенное нами структурное изучение модификации А [2,5] показало отсутствие образования

молекулярных комплексов со спиртом в присутствии хлороформа, что и позволяет трактовать различия в ИК- спектрах, особенно в области валентных колебаний $\nu(\text{C-O})$ карбонильных групп, как проявление полиморфизма.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Витол В. Н., Ванаг Г. Я. // Изв. АН ЛатвССР. 1955. № 9. С. 111-113.
2. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М.: Мир, 1993. Т.2. С. 330.
3. Burger A., Ramberger R. // Mikrochimica Acta. 1979. II. S. 273-316.
4. Валика В. В., Бабилов Ф. В., Андроник И. Я. В кн. «Наука фармац. практ.» Кишинев, 1984, С. 27-28.
5. Бабилов Ф. В. // Фарм. ж. 1988. № 1. С. 51-4.
6. Kuhnert-Brandstaetter M., Wurian I., Geiler M. // Sci. Pharm. 1982. V. 52. № 3. P.208-216.
7. Bouche R., Draguet-Brughmans N. // J. Pharm. Belg. 1977. 32. №. 1. P. 23-51.
8. Haleblan J., Mc Crone W. // J. Pharm. Sci. 1969. V. 58. № 8. P. 911-928.
9. Магомедова Н. С., Шифрина Р. Р., Бельский В. К. // Ж. физ. хим. 1985. Т. 59. №. 2. С. 365-370.
10. Зелмен В. Н., Дубур Д., Аренс А. // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1973. № 6. С. 741-746.
11. Шагун В. А., Сидоркин В. Ф., Усов В. А., и др. // Изв. АН СССР Сер. хим. 1981. № 8. С. 1747-1751.
12. Лиепиньш Э. Э., Петрова М. В., Паулиньш Я. Я., Гудриенце Э. Ю. // ДАН СССР. Т. 300. 1988. С. 893-896.
13. Усова Т. Л., Корчевин Н. А., Усов В. А., Воронков М. Г. // Ж. орг. химии. 1980. Т. 16. № 8. С. 1789-1790.
14. Антипин М. Ю., Петрова М. В., Паулиньш Я. Я., и др. // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1989. № 1. С. 102-107.
15. Korp J. D., Bernal I., Lemke T. L. // Acta Cryst. Sect. B. 1980. V. 36B. P. 428-434.
16. Магомедова Н. С., Звонкова З. В., Гейта Л. С., и др. // Журн. структ. химии. 1980. Т. 21. № 1. С. 131-136.

С.У. Крейнгольд

профессор,

А.Н. Кочетов

аспирант,

кафедра Неорганической химии,

МИТХТ им М.В. Ломоносова

К.А. Шестаков*

заведующий Химической

лабораторией Испытательного

Лабораторного Центра

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА В ПРИСУТСТВИИ АЛКИЛДИМЕТИЛБЕНЗИЛАММОНΙΑ

УДК 543.8:543.432

Предложена методика определения полигексаметиленгуанидина (ПГ) в присутствии алкилдиметилбензиламмония (АБА) в дезинфицирующих средствах, основанная на измерении оптической плотности ионного ассоциата ПГ с эозином К при длине волны 555 нм в растворах, стабилизированных синтанолом, при pH 9,2.

Известна методика фотометрического определения ПГ, основанная на измерении оптической плотности продуктов реакции ПГ с иодом [1]. Однако, такие же окрашенные продукты с иодом образуют и мономерные катионные ПАВ, например, алкилдиметилбензиламмоний (АБА).

Поэтому методика непригодна для определения ПГ в присутствии АБА, который вводится в некоторые дезинфицирующие средства вместе с ПГ.

Предлагаемая методика определения ПГ в присутствии АБА основана на измерении оптической плотности ионного ассоциата ПГ с эозином К при длине волны 555 нм, где поглощение ионного ассоциата эозина с АБА в расчете на единицу массы примерно в 8 раз слабее. Существенно, что в качестве реагента используется не эозин Н, являющийся смесью ди- и тетрабромфлуоресцеина, а эозин К, являющийся индивидуальным соединением.

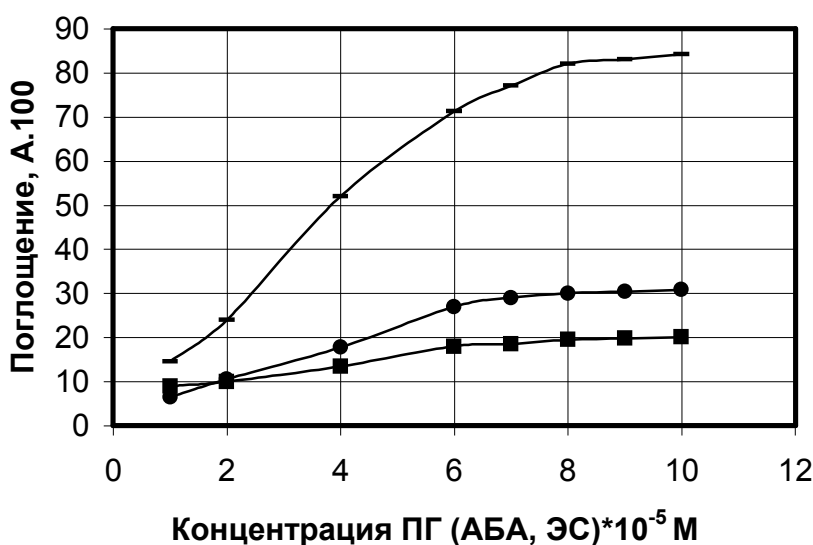


Рисунок 1. Данные фотометрирования (555 нм) серии растворов при pH 9,2 с постоянной концентрацией эозина К ($4 \cdot 10^{-5}$ М) и возрастающей концентрацией АБА (■), ПГ (—) и ЭС (●) относительно $4 \cdot 10^{-5}$ М раствора эозина К. Концентрация синтанола 0,02%.

Чтобы учесть поглощение ионного ассоциата АБА с эозином К, в контрольный раствор вводится АБА в концентрации, которая рассчитывается по результатам титриметрического определения массовой доли АБА в средстве [2].

Определению АБА присутствие ПГ не мешает.

Измерения проводят при pH 9,2, где эозин присутствует в виде двухзарядного аниона. Это обеспечивает целочисленное стехиометрическое отношение ПГ (или АБА) и эозина К в составе ионного ассоциата. По данным фотометрирования серии растворов с постоянной концентрацией эозина и возрастающей концентрацией ПГ (или АБА) излом кривой наблюдается при мольном соотношении эозин: ПГ (или АБА) равном

1 : 2 (рис. 1) в соответствии с зарядом АБА и элементарной ячейки ПГ (+1) и зарядом эозина (-2).

Выбор длины волны для фотометрирования ионного ассоциата эозина К с ПГ сделан на основе сравнения спектров поглощения ионных ассоциатов эозина К с ПГ и АБА (рис. 2). Другой полимер на основе гуанидина - поли-(4,9-диоксадодекан-1,12-гуанидин), «Экосепт» (ЭС) - также образует ионные ассоциаты с эозином, но они поглощают менее интенсивно, чем ассоциаты ПГ.

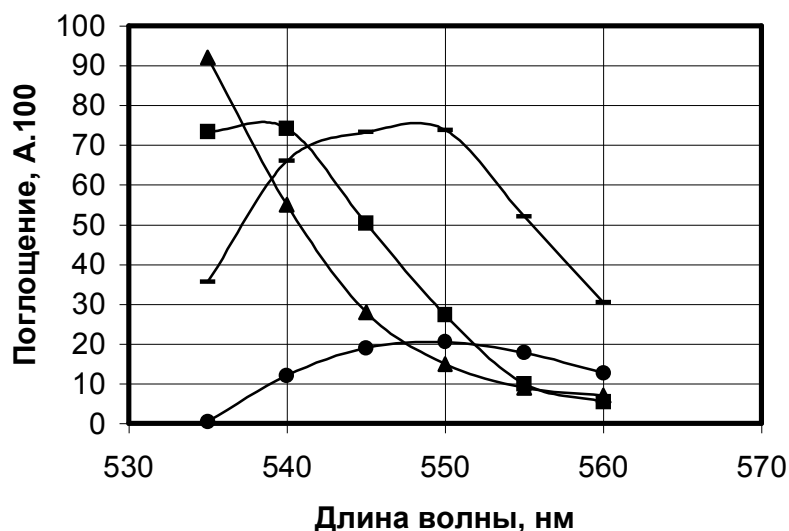


Рис. 2. Спектры поглощения $4 \cdot 10^{-5}$ М раствора эозина К при pH 9,2 (▲) и ионных ассоциатов эозина К с $4 \cdot 10^{-5}$ М АБА (■), ПГ (—) и ЭС (●) относительно $4 \cdot 10^{-5}$ М раствора эозина К. Концентрация синтанола 0,02%.

Ионные ассоциаты эозина с ПГ и АБА мало растворимы, что вызывает неустойчивость растворов во времени. Чтобы предотвратить выпадение ионных ассоциатов в осадок, в раствор вводят синтанол в концентрации, которая превышает 0,01% - критическую концентрацию мицеллообразования.

Различия в спектрах поглощения ионных ассоциатов полимера ПГ и мономерного катионного ПАВ АБА могут быть связаны с особенностями окружения молекул эозина в полимерной матрице. В таком случае возможны различия в спектрах ионных ассоциатов эозина с ПГ разной степени полимеризации. Действительно, спектры поглощения ионных ассоциатов эозина со стандартными образцами ПГ,

характеризующимися значениями $\eta = 0,04-0,07$, различаются.

Установлено, что присутствие двукратного избытка (по отношению к ПГ) вспомогательных веществ: уротропина, мочевины, трилона Б, синтамида-5 и неонола АФ 8–10, которые могут вводиться в состав композиции дезинфицирующих средств наряду с действующим веществом – ПГ, не оказывает существенного влияния на фотометрические свойства продукта его взаимодействия с эозином К. Это обстоятельство дает возможность определять ПГ в присутствии широкого спектра вспомогательных веществ по приведенной ниже методике, учитывая их поглощение при длине волны 555 нм в

растворах, стабилизированных синтанолом, при pH 9,2.

Методика определения ПГ проверена на модельных растворах смеси АБА и ПГМГ, а также на примере анализа средства «Демос», содержащего 1 % АБА и 2,5% ПГ. Также представляется возможным определение другого дезинфектанта ЭС в приведенных ниже условиях при не менее чем десятикратном увеличении навески препарата.

Описание определения. Навеску средства «Демос», равную 1,0 г, взятую с точностью $\pm 0,01$ г, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см^3 , доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Отбирают 1 см^3 раствора, вносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 , приливают 20 см^3 воды, $0,2 \text{ см}^3$ 2%-ного раствора синтанола, 1 см^3 боратного буферного раствора с pH 9,2 и $1,0 \text{ мл } 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ раствора эозина К. Доводят объем раствора в колбе водой до метки, перемешивают и фотометрируют при 555 нм на спектрофотометре в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см относительно раствора сравнения, содержащего $0,2 \text{ см}^3$ 2%-ного раствора синтанола, 1 см^3 боратного буферного раствора с pH 9,2, $1,0 \text{ мл } 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ раствора эозина К и рассчитанный по формуле (1) приведенной в методике [2] объем $0,001 \text{ М}$ раствора АБА ($V_{\text{АБА}}$).

$$V_{\text{АБА}} = \mu_{\text{АБА}} \cdot G \cdot V_{\text{ал}} / (V_{\text{г}} \cdot 356 \cdot 10^{-6}) \quad (1)$$

В выбранных выше условиях анализа препарата «Демос» $V_{\text{АБА}} = 0,36 \text{ мл}$.

Одновременно строят градуировочный график. Для этого в пять мерных колб вместимостью 25 мл вводят соответственно

0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мг ПГ (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл раствора ПГ с концентрацией 0,1 мг/мл и с характеристической вязкостью соответствующей используемой в дезсредстве «Демос» ($\eta = 0,07$)).

Последующие манипуляции с растворами аналогичны выше описанным за исключением добавки АБА к раствору сравнения. По градуировочному графику определяют концентрацию ПГ в анализируемой пробе (C , мг/мл). Содержание ПГ рассчитывают по формуле (2):

$$\% \text{ПГ} = C \cdot 10^{-3} \cdot V_{\text{г}} \cdot 100\% / \cdot G \quad (2)$$

где C – концентрация ПГ в анализируемой пробе (мг/мл), найденная по градуировочному графику, $V_{\text{г}}$ – объем раствора, в котором растворена навеска, равный 100 см^3 , $V_{\text{ал}}$ – объем аликвотной части раствора, равный 1 см^3 , G – навеска средства, г, $\mu_{\text{АБА}}$ – массовая доля АБА в средстве «Демос», равная 0,01, 356 – молекулярная масса АБА, г/моль, 10^{-6} количество моль в 1 см^3 $0,001 \text{ М}$ раствора АБА, 10^{-3} коэффициент пересчета из мг в г.

В образце средства «Демос» по результатам трех параллельных определений найдено $(2,2 \pm 0,2)\%$ ПГ. За результат анализа принимают среднее арифметическое значение трех параллельных определений, допускаемое относительное расхождение между которыми не должно превышать 10%. Доверительный интервал суммарной относительной погрешности результата определения не превышает 6%. Результат анализа округляется до первого десятичного знака после запятой.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бузланова М.М., Каранди И.В., Китаева Д.Х. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов, № 4. Т. 63. 2003. С. 18.
2. Крейнгольд С.У. Практическое руководство по химическому анализу дезинфекционных препаратов. М. Экспресспринт, 2002. С. 39.

Е.В. Савинкина*доцент,***М.Н. Давыдова***доцент**кафедра Неорганической химии,**МИТХТ им М.В. Ломоносова***УТОЧНЕНИЕ СОСТАВА И
ОБЛАСТЕЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ
ПОЛИИОДИДОВ В ЧЕТВЕРНЫХ
СИСТЕМАХ $MI_2-Ur-I_2-H_2O$**

УДК 546.15.546.712

По данным физико-химического анализа тройных систем, включающих иодид металла или его комплекс с карбамидом (Ur), иод и воду, и рентгенофазового анализа образующихся соединений уточнены составы и области кристаллизации комплексных соединений в четверных системах $MI_2-Ur-I_2-H_2O$ ($M = Mn, Co, Ni$).

Полиииодиды относятся к числу электропроводящих соединений [1] и могут применяться в качестве катодного материала для источников тока с литиевым анодом и датчиков температуры [2].

Ранее были изучены системы, содержащие иодиды металлы или комплексы с мочевиной (Ur) различного состава (с соотношением $Ur: MI_2$ от 4 до 10), иод и воду ($M = Mn, Co, Ni$) при 0 °C [3–7]. При использовании в качестве исходных комплексов $MI_2 \cdot 10Ur$ выделяются полиииодиды с мольным отношением $I_2: MI_2$, равным 2:1, а при использовании комплексов состава $MI_2 \cdot 4Ur \cdot 2H_2O$ в системах кристаллизуются полиииодиды с мольным отношением $I_2: MI_2 = 3:1$ ($M = Mn, Co, Ni$). При этом в системе $MI_2 \cdot 10Ur-I_2-H_2O$ обнаружено образование полиииодида, содержащего более двух молей I_2 на моль MnI_2 , а в системе $MnI_2-I_2-H_2O$ – соединения состава $MnI_2 \cdot 8H_2O \cdot 2I_2$. Все образующиеся полиииодиды инконгруэнтно растворимы в воде.

Исследование кристаллических структур полиииодидов карбамидных комплексов переходных элементов методом рентгеноструктурного анализа [8, 9] позволило уточнить их состав. Было показано, что при кристаллизации комплексных полиииодидов в тройных системах $MI_2 \cdot nUr-I_2-H_2O$ ($n = 4, 10$) происходит изменение числа молекул

карбамида, входящих в состав соединения. При взаимодействии декакарбамидных комплексов иодидов металлов с иодом число молекул мочевины в составе соединения уменьшается от 10 до 8 (число внешнесферных молекул – от 4 до 2), а при взаимодействии тетракарбамидных производных с иодом наблюдается вытеснение внутрисферных молекул воды молекулами карбамида и увеличение числа последних в составе соединения от 4 до 6. Таким образом, при кристаллизации соединений из водного раствора одновременно меняется содержание и карбамида, и иода, и воды. Поэтому, несмотря на то, что исходные карбамидсодержащие соединения конгруэнтно растворимы в воде при 0 °C, тройные системы, содержащие карбамидные производные иодида марганца, кобальта или никеля, иод и воду, не являются стабильными разрезами четверных систем $MI_2-Ur-I_2-H_2O$.

В оконтуривающих тройных системах MI_2-Ur-H_2O , изученных при более высоких температурах (15–30 °C) [10], были обнаружены соединения следующих составов: $MI_2 \cdot 10Ur$ ($M = Mn, Co, Ni$), $MI_2 \cdot 6Ur$ ($M = Mn, Co, Ni$), $MI_2 \cdot 4Ur$ ($M = Mn, Ni$), $CoI_2 \cdot 4Ur \cdot 2H_2O$, $MnI_2 \cdot Ur \cdot H_2O$.

Однако в ходе препаративных синтезов иодидов комплексов марганца, железа, кобальта и никеля с мочевиной, которые проводили при комнатной температуре, смешивая компоненты в соотношениях, отвечающим областям кристаллизации соответствующих соединений на диаграммах растворимости, описанные в [10] соединения состава $MnI_2 \cdot Ur \cdot H_2O$ и $MI_2 \cdot 6Ur$ ($M = Co, Ni$) выделить не удалось. Комплексы марганца и никеля с мочевиной с соотношением $MI_2: Ur = 1:4$

содержали воду и имели состав $M\text{I}_2 \cdot 4\text{Ur} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M = \text{Mn}, \text{Ni}$). Кроме того, из водного раствора, содержащего иодид кобальта и мочевины, был получен ранее не известный комплекс состава $\text{CoI}_2 \cdot \text{Ur} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$.

Таким образом, в системе $\text{MnI}_2\text{--Ur--I}_2\text{--H}_2\text{O}$ в общей сложности кристаллизуются девять соединений: исходные компоненты $\text{MnI}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Ur и I_2 , три комплекса иодида марганца с мочевиной состава $\text{MnI}_2 \cdot 4\text{Ur} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnI}_2 \cdot 6\text{Ur}$ и $\text{MnI}_2 \cdot 10\text{Ur}$ и три полииодида состава $\text{MnI}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{I}_2$, $\text{MnI}_2 \cdot 6\text{Ur} \cdot 3\text{I}_2$ и $\text{MnI}_2 \cdot 8\text{Ur} \cdot 2\text{I}_2$. В системе $\text{CoI}_2\text{--Ur--I}_2\text{--H}_2\text{O}$ кристаллизуются восемь соединений: исходные компоненты $\text{CoI}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Ur и I_2 , три комплекса иодида кобальта с мочевиной состава $\text{CoI}_2 \cdot \text{Ur} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoI}_2 \cdot 4\text{Ur} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CoI}_2 \cdot 10\text{Ur}$ и два

полииодида состава $\text{CoI}_2 \cdot 6\text{Ur} \cdot 3\text{I}_2$ и $\text{CoI}_2 \cdot 8\text{Ur} \cdot 2\text{I}_2$. В системе $\text{NiI}_2\text{--Ur--I}_2\text{--H}_2\text{O}$ кристаллизуются семь соединений: исходные компоненты $\text{NiI}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Ur и I_2 , два комплекса иодида никеля с мочевиной состава $\text{NiI}_2 \cdot 4\text{Ur} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{NiI}_2 \cdot 10\text{Ur}$ и два полииодида состава $\text{NiI}_2 \cdot 6\text{Ur} \cdot 3\text{I}_2$ и $\text{NiI}_2 \cdot 8\text{Ur} \cdot 2\text{I}_2$.

Построение фазовых диаграмм для столь сложной системы представляет серьезные трудности. Тем не менее, результаты [3–7] с использованием данных [10] (экстраполированных до температуры 0°C) и правила Гиббса позволили схематично представить центральные проекции четверных диаграмм на плоскость $\text{MI}_2\text{--Ur--I}_2$, показывающие области кристаллизации комплексных иодидов и полииодидов при 0°C (рис. 1–3).

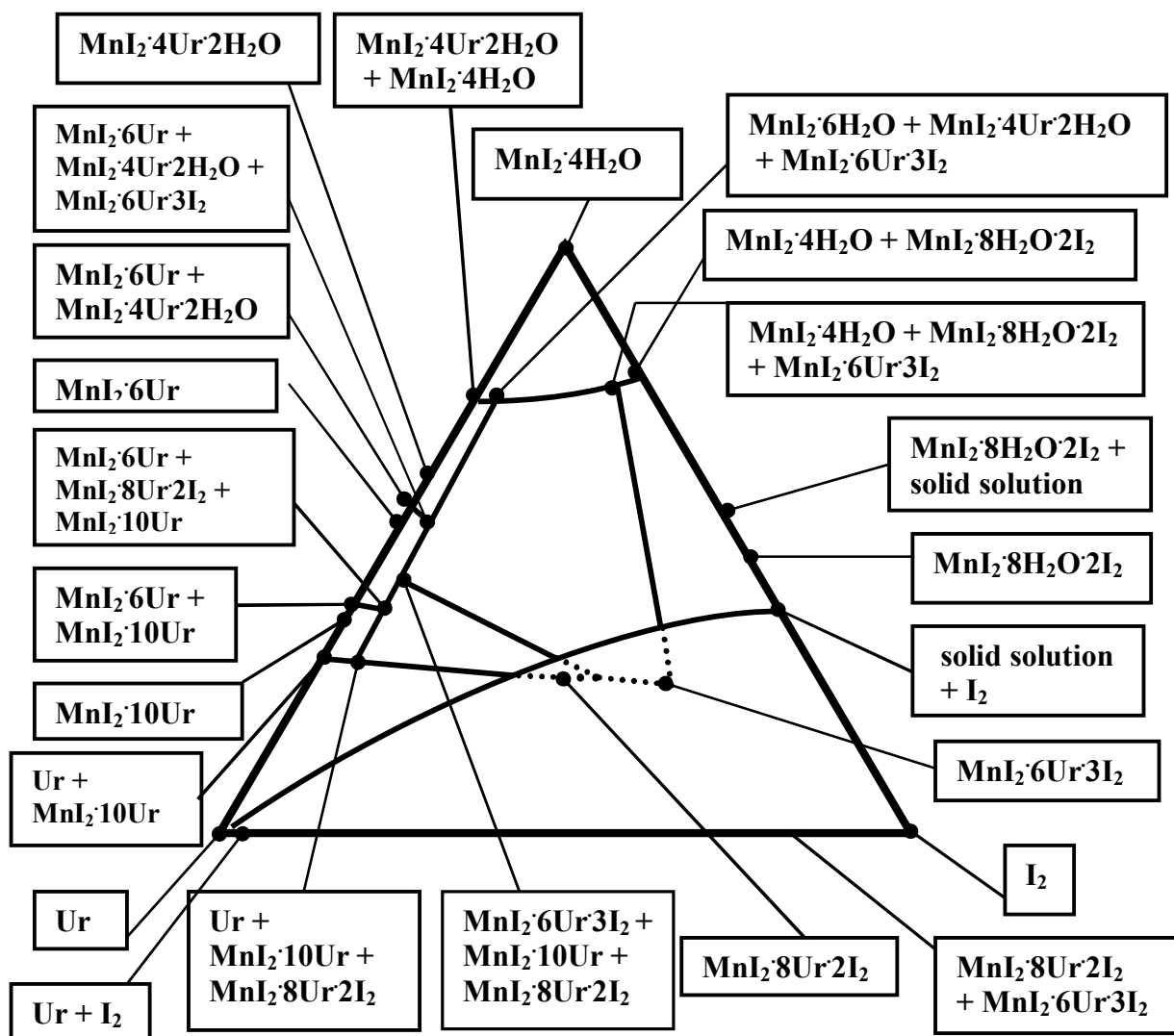


Рис. 1. Фазовая диаграмма $\text{MnI}_2\text{--Ur--I}_2\text{--H}_2\text{O}$: центральная проекция на плоскость $\text{MnI}_2\text{--Ur--I}_2$.

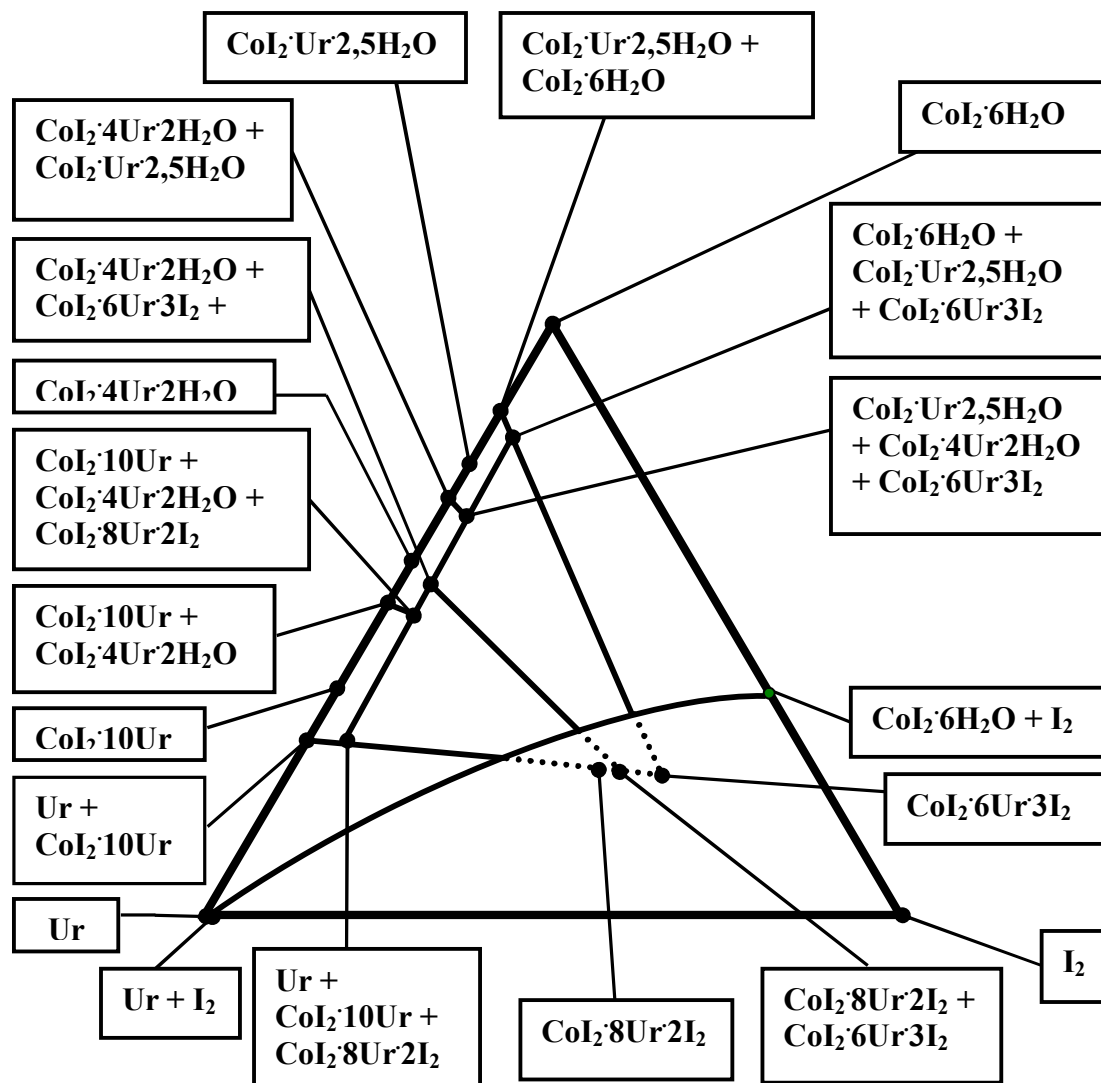


Рис. 2. Фазовая диаграмма $\text{CoI}_2\text{--Ur--I}_2\text{--H}_2\text{O}$: центральная проекция на плоскость $\text{CoI}_2\text{--Ur--I}_2$.

Поскольку при взаимодействии карбамидных производных марганца, кобальта и никеля с иодом в большинстве случаев происходит изменение числа молекул карбамида как во внутренней, так и во внешней сфере комплексов, предварительный синтез карбамидных производных иодидов металлов для получения комплексных полииодидов нецелесообразен. В качестве исходных веществ для получения полииодидов следует использовать кристаллогидраты соответствующих иодидов металлов,

карбамид, иод и воду. Их смешивают в соотношениях, приведенных в таблице, добавляют воду, растирают при комнатной температуре до перехода смеси в гомогенное состояние, а затем охлаждают до температуры 0–10 °С. Образовавшиеся кристаллические полииодидные соединения темно-коричневого ($\text{MI}_2\cdot 8\text{Ur}2\text{I}_2$) или черного ($\text{MI}_2\cdot 6\text{Ur}3\text{I}_2$) цвета отделяют от маточного раствора на холоду с помощью стеклянного фильтра и высушивают до постоянной массы в эксикаторе над хлоридом кальция.

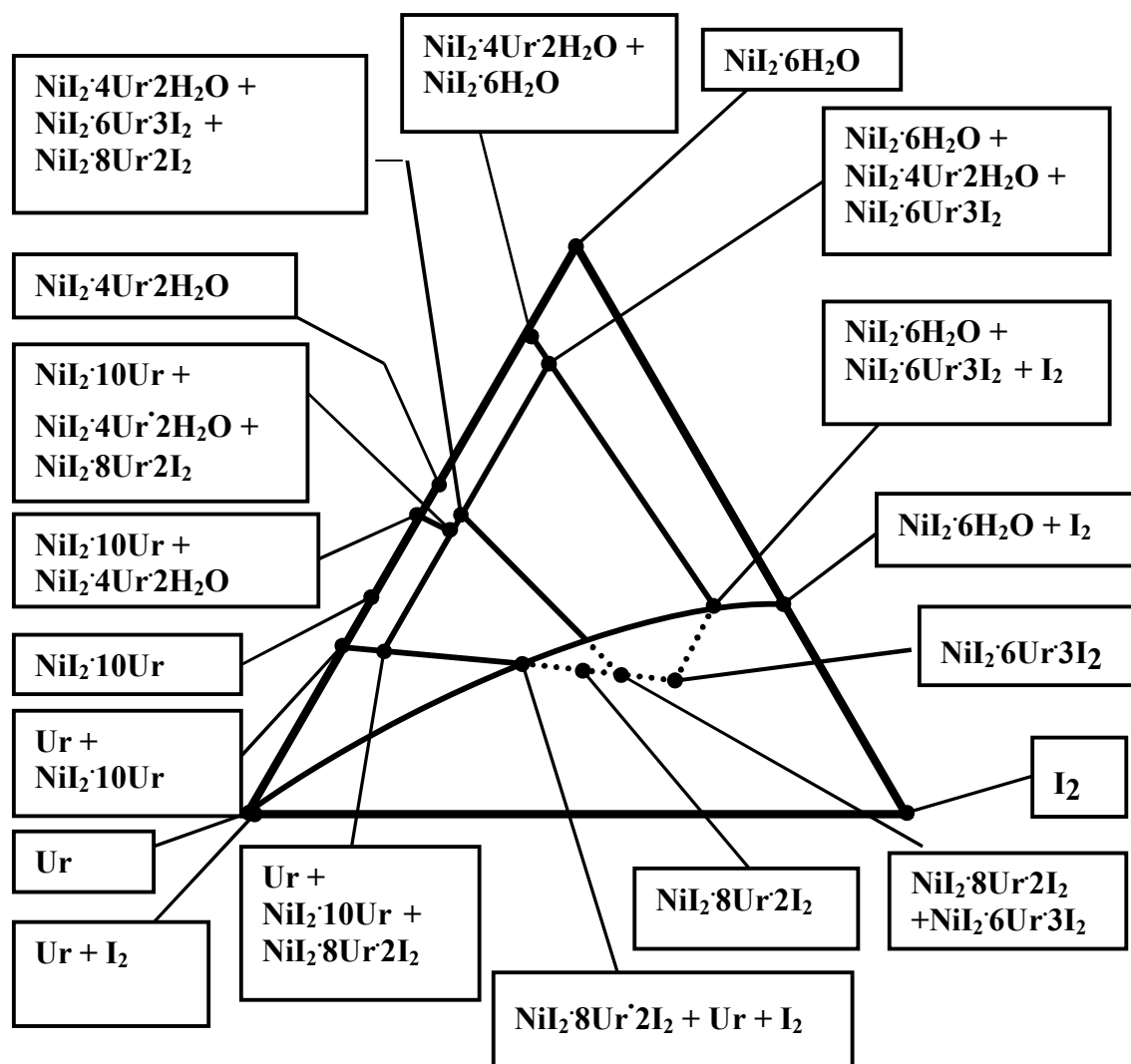
Рис. 3. Фазовая диаграмма $\text{NiI}_2\text{--Ur--I}_2\text{--H}_2\text{O}$: центральная проекция на плоскость $\text{NiI}_2\text{--Ur--I}_2$.

Таблица 1. Массы реагентов (в г на 100 г реакционной смеси) при синтезе полииодидов

Соединение	MI_2	Ur	I_2
$\text{MnI}_2 \cdot 8\text{Ur} \cdot 2\text{I}_2$	21–28	40–50	10–14
$\text{CoI}_2 \cdot 8\text{Ur} \cdot 2\text{I}_2$	23–33	30–40	5–13
$\text{NiI}_2 \cdot 8\text{Ur} \cdot 2\text{I}_2$	23–33	30–40	5–13
$\text{MnI}_2 \cdot 6\text{Ur} \cdot 3\text{I}_2$	32–40	18–25	15–22
$\text{CoI}_2 \cdot 6\text{Ur} \cdot 3\text{I}_2$	43–53	14–21	7–17
$\text{NiI}_2 \cdot 6\text{Ur} \cdot 3\text{I}_2$	43–53	13–23	7–17

Так как области кристаллизации полииодидов во всех изученных системах достаточно велики, они выделяются из реакционной смеси в широком интервале концентраций исходных веществ. Однако, поскольку образующиеся соединения растворимы в воде инконгруэнтно, для

получения продуктов высокой чистоты кристаллизация должна осуществляться в условиях пониженного (по сравнению со стехиометрическим) количества иода. Соотношения реагентов выбраны таким образом, чтобы фигуративная точка, отвечающая реакционной смеси, попадала

в область кристаллизации комплексного полииодида. Следует отметить, что при увеличении содержания воды в реакционной смеси понижается выход продукта за счет увеличения количества веществ, остающихся в маточном растворе. Если же содержание воды в реакционной смеси меньше, чем требуется

по таблице, то при комнатной температуре не образуется гомогенная смесь, поэтому существует опасность получения смеси веществ вместо целевого продукта.

Для получения монокристаллов реакционную смесь не охлаждают, а подвергают медленному изотермическому выпариванию при комнатной температуре.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Svensson, P.H., Kloo, L. Synthesis, structure, and bonding in polyiodide and metal iodide–iodine systems. //Chem. Rev., 2003, 103, № 5, 1649–1684.
2. Цыганков В.Н., Горилловская Н.Б., Аликберова Л.Ю., Савинкина Е.В., Рукк Н.С. Датчик температуры и способ его изготовления. Авт. св. СССР № 1290094 от 14.06.1985.
3. Аликберова Л.Ю., Савинкина Е.В., Степин Б.Д. Взаимодействие карбамидных комплексов иодидов кобальта и никеля с иодом в водной среде при 0 °С. // Журн. неорган. химии, 1987, 32, № 6, 1507–1510.
4. Савинкина Е.В., Аликберова Л.Ю., Степин Б.Д., Терентьева И.А. Взаимодействие карбамидных комплексов иодида марганца с иодом в водной среде при 0°С. //Журн. неорган. химии, 1988, 33, № 8, 2170–2172.
5. Савинкина Е.В., Аликберова Л.Ю., Степин Б.Д. Взаимодействие иодида железа с карбамидом и иодом в водной среде при 0 °С. // Журн. неорган. химии, 1988, 33, № 10, 2665–2668.
6. Савинкина Е.В., Аликберова Л.Ю., Степин Б.Д. Взаимодействие тетракарбамидных комплексов иодидов марганца, кобальта и никеля с иодом в водной среде при 0 °С. //Журн. неорган. химии, 1989, 34, № 4, 1045–1047.
7. Савинкина Е.В., Рукк Н.С., Аликберова Л.Ю., Степин Б.Д., Терентьева И.А. Взаимодействие иодидов некоторых переходных элементов с иодом в водной среде при 0 °С. //Журн. неорган. химии, 1989, 34, № 4, 1048–1051.
8. Кузьмина Н. Е., Палкина К. К., Савинкина Е.В., Козлова И.А., Кузнецов Н.Т. Синтез и кристаллическая структура $[\text{Co}(\text{Ur})_6][\text{I}_8]$. // Журн. неорган. химии, 2000, 45, № 1, 10–14.
9. Кузьмина Н. Е., Палкина К. К., Савинкина Е.В., Кузнецов Н.Т., Козлова И.А. Синтез и кристаллическая структура дианоидатов карбамидных производных никеля(II) и кобальта(II) $[\text{Ni}(\text{CON}_2\text{H}_4)_6][\text{I}_3]_2 \cdot 2(\text{CON}_2\text{H}_4)$ и $\text{Co}(\text{CON}_2\text{H}_4)_6[\text{I}_3]_2 \cdot 2(\text{CON}_2\text{H}_4)$. //Журн. неорган. химии, 2000, 45, № 5, 780–789.
10. Сулайманкулов К., Абыкеев К., Мурзубраимов В., Ногоев К. Атлас диаграмм растворимости водно-солевых карбамидных систем. – Фрунзе: Илим, 1980.

Аднан А. Джассим
аспирант,
А.И. Кузнецов,
профессор
кафедра Органической химии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

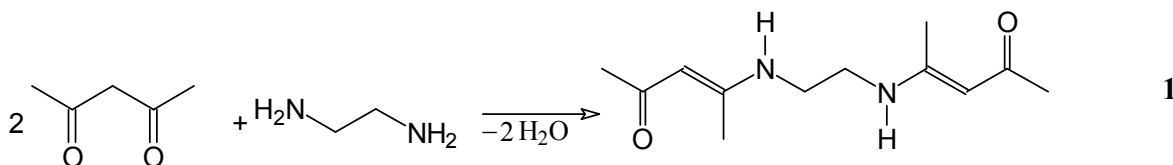
КОНДЕНСАЦИЯ АЦЕТИЛАЦЕТОНА С ДИАМИНАМИ

УДК: 547.853.5.78

Конденсацией ацетилацетона с диаминами получены соединения, способные образовывать комплексы с солями различных металлов, в том числе и кобальта, представляющие интерес своей потенциальной противораковой активностью. Строение продукта конденсации гексаметилендиамина с ацетилацетоном определено рентгеноструктурным анализом.

Разрабатывая методы получения каркасных продуктов конденсации

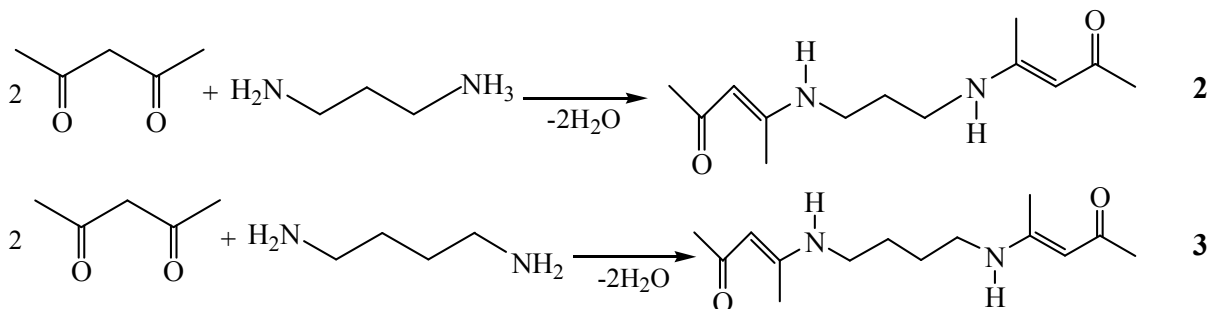
диаминов с карбонильными соединениями [1,2], мы подошли к изучению конденсации ацетилацетона с диаминами. Изучая конденсацию этилендиамина с ацетилацетоном, мы обнаружили, что при любом соотношении реагентов и при различных условиях проведения реакции образуется один и тот же продукт конденсации двух молекул ацетилацетона с одной молекулой этилендиамина 5,8-диаза-4,9-диметилдодека-3,9-диен-2,11-дион **1** [3,4].

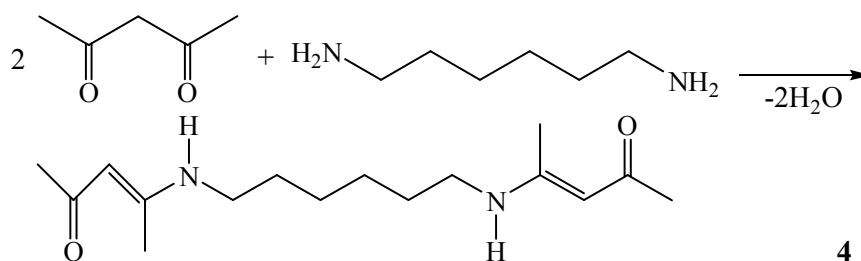


Этот продукт привлек внимание исследователей тем, что его внутрикомплексные соединения с солями различных металлов могут использоваться для селективного выделения металлов и как модели органометаллических соединений типа витамина B₁₂ [5].

В последнее время было показано, что внутрикомплексное соединение **1** с кобальтом является чуть ли самыми перспективными на сегодня противораковыми препаратом [6]. Это побудило нас синтезировать и изучить еще не описанные продукты конденсации ацетилацетона с другими диаминами.

Комплексы этих продуктов с различными металлами, в том числе и с двумя атомами металла, находящимися в непосредственной близости друг от друга могут представить интерес и в других областях науки и техники. Проведенные нами исследования показали, что и при конденсации ацетилацетона с 1,3-диаминопропаном при любых соотношениях реагентов также образуется продукт конденсации одной молекулы диамина с двумя молекулами ацетилацетона 5,9-диаза-4,10-диметилтридека-3,10-диен-2,12-дион **2**.



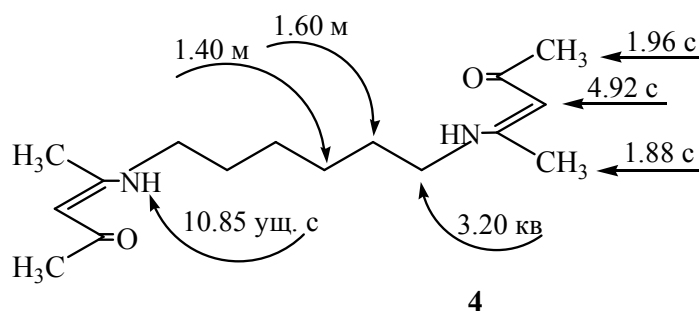


Аналогичным образом конденсацией ацетилацетона с 1,4-диаминобутаном и 1,6-диаминогексаном нами впервые были получены 5,10-диаза-4,11-диметилтетрадека-3,11-диен-2,13-дион **3** и 5,12-диаза-4,12-диметилгексадека-3,12-диен-2,14-дион **4**.

Брутто-формулы полученных соединений **1-4** были установлены по их масс-спектрам, в которых наблюдаются пики молекулярных ионов M^+ с m/z 224(5) **1**, 238(44) **2**, 252(10) **3** и 280(14) **4** малой и средней интенсивности. Характерным направлением распада всех

четырёх молекулярных ионов является отщепление частицы с массой 100.

Особенно информативны их спектр ЯМР 1H . Четыре протона этиленового мостика NCH_2CH_2N в соединении **1** резонируют в виде слегка уширенного синглета при 3,45 м.д. Протоны пропиленового $NCH_2CH_2CH_2N$ мостика соединения **2** дают квадруплет от четырех протонов CH_2N при 3,35 м. д. и мультиплет от двух протонов CH_2C при 2,88 м. д.



Строение продукта конденсации гексаметилентетрамина с ацетилацетоном **4** было определено рентгеноструктурным анализом (рис. 1).

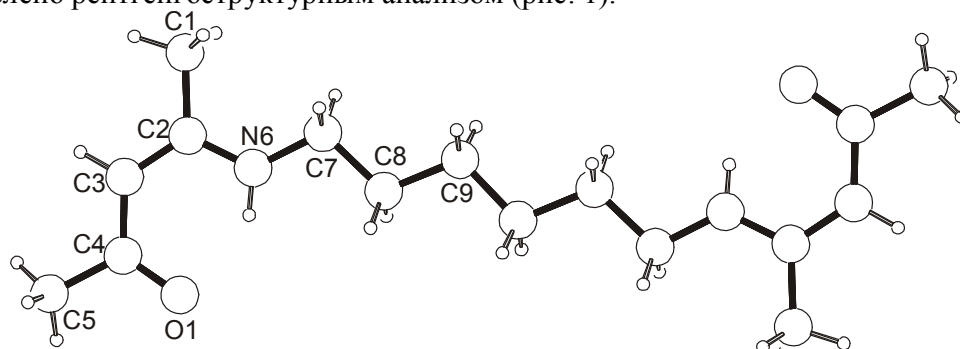
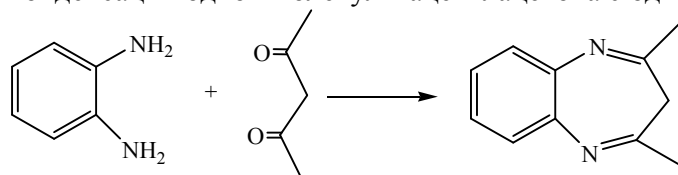


Рис.1. Строение продукта реакции ацетилацетона с гексаметилентетрамином по данным рентгеноструктурного анализа

Конденсацией ацетилацетона с о-фенилендиаминном с выходом 35% получен продукт конденсации одной молекулы ацетилацетона с одной молекулой о-фенилендиамина **5**.

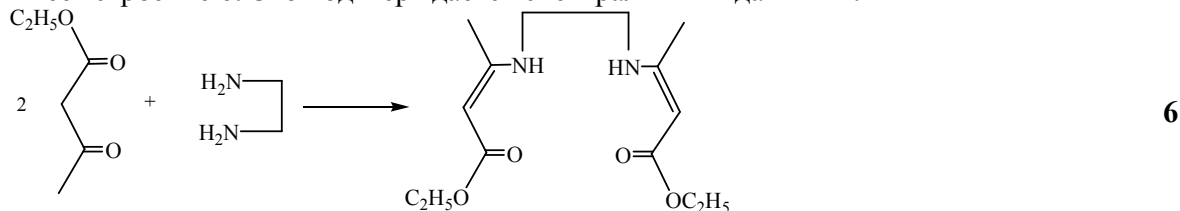


5

В масс-спектре соединения **5** наблюдается пик молекулярного иона M^+ с m/z 172 максимальной интенсивности.

Представлялось интересным изучить конденсацию этилендиамина с ацетоуксусным эфиром с целью установления реакционного центра китозфира в этой реакции.

Это говорит о том, что реакция прошла по карбонильной группе и полученный продукт имеет строение **6**. Это подтверждается спектральными данными.



В масс-спектре соединения **6** наблюдается пик молекулярного иона M^+ с m/z 284 средней (23%) интенсивности. В его ИК спектре наблюдается интенсивная полоса поглощения карбонильной группы $C=O$ в области 1604 и 1652 см^{-1} и группы $N-H$ в области 3296 см^{-1} .

В результате проведенного исследования получены продукты конденсации ацетилацетона с высшими диаминами и ацетоуксусного эфира с этилендиамин. Комплексы этих соединений с кобальтом обладают потенциальной противораковой активностью.

Таблица 1. Аналитические данные для соединений 1 – 6

№	Вых. %	Т.пл. °С	Формула	Найдено, %			Вычислено, %		
				C	H	N	C	H	N
1	89	110-111	$C_{12}H_{20}N_2O_2$	63.63	09.30	12.24	64.24	9.00	12.50
2	88	50 – 51	$C_{13}H_{22}N_2O_2$	65.51	09.28	11.69	65.50	9.32	11.75
3	85	86 – 88	$C_{14}H_{24}N_2O_2$	66.90	09.73	11.87	66.61	9.60	11.10
4	92	75 – 77	$C_{16}H_{28}N_2O_2$	68.61	10.24	09.86	68.51	10.08	09.99
5	45	130-132	$C_{11}H_{12}N_2$	76.59	07.12	16.29	76.69	07.03	16.26
6	33	115-117	$C_{14}H_{24}N_2O_4$	59.11	08.52	09.85	59.17	08.82	10.02

Экспериментальная часть:

1. Спектры ЯМР 1H исследуемых соединений записывались на спектрометрах WM-250 (Bruker) для 2-3% растворов в $CDCl_3$, DMSO или D_2O при частоте 230.13 МГц. Химические сдвиги протонов измерены по отношению к внутреннему эталону- TMS.

2. ИК спектры исследуемых соединений зарегистрированы на спектрометрах Specord71-IR, в суспензии вещества в вазелиновом масле или таблетках KBr с использованием NaCl в интервале частот $2500 - 3800\text{ см}^{-1}$, скорость сканирования $150\text{ см}^{-1}/\text{Мин}$.

3. Масс-спектры низкого и высокого разрешения получены на приборе MAT-90 фирме "Finnigan MRT" с прямым образца в источник ионов, при напряжении 5,0 КВ, ток эмиссии катода 100 МКА, энергии ионизирующих электронов 70 эВ и температуре ионизирующей камеры 200°C . В качестве стандарта использован перфторкеросин. Разрешение $M/\Delta M=10000$. Температура системы напуска 20°C .

4. Экспериментальный материал для кристаллов получен на автоматическом дифрактометре Enraf-Nonius CAD-4 (MoK_α -излучение, графитовый монохроматор). Структуры расшифрованы прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов (МНК) в полноматричном анизотропном приближении для всех неводородных атомов. Атомы водорода определены из геометрического анализа и включены в уточнение по модели <<наездника>> с изотропными температурными параметрами (для всех H атомов $U_{\text{экв}} = 0.08\text{ \AA}^2$). Все расчеты проведены по программам SHELXS86 и SHELXL93.

5. Контроль за ходом реакций и индивидуальностью веществ осуществляли методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254. Пятна проявляли парами иода во влажной камере или в УФ свете.

5,8-Диаза-4,9-диметилдодека-3,10-диен-2,11-дион (1). К 3,0 г (50 ммоль) этилендиамина при перемешивании и охлаждении с такой скоростью, чтобы температура сильно экзотермической реакции не превышала $40-50^\circ\text{C}$, прибавляли 10 г (100 ммоль) ацетилацетона и оставляли на 12 ч при обычной температуре. Выпавшие кристаллы отфильтровали и перекристаллизовали из петролейного эфира. Получили 10 г (89%) [бис(ацетилацетон) этилендиамин] **1**, т.пл. $110-111^\circ\text{C}$ (113°C [7]).

Спектр ЯМР 1H , δ , М.Д.: 10.9 с (2H, NH-C), 5.00 с (2H, CH), 3.45 с (4H, NCH_2CH_2), 2.02 с (6H, CH_3), 1.93 с (6H, CH_3).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 224(5), 125(99), 112(100), 98(94), 82(55), 70(48), 43(47).

ИК (KBr): 1608, 1580, 1520, 740 см^{-1} .

5,9-Диаза-4,10-диметилтридека-3,10-диен-2,12-дион (2). К 3,7 г (50 ммоль) 1,3-диаминопропана при перемешивании и охлаждении с такой скоростью, чтобы температура реакции не превышала 40–50°C, прибавляли 10 г (100 ммоль) ацетилацетона и оставляли на 36 ч при обычной температуре. Образовавшиеся кристаллы перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получили 10,5 г (88%) бис(ацетилацетон)диаминопропан **2**, т.пл. 50–51°C.

Спектр ЯМР ^1H , δ , М.Д.: 10,87 с (2H, NH–C), 5,00 с (2H, CH), 3,35 кв (4H, $\text{NCH}_2\text{CCH}_2\text{N}$), 1,99 с (6H, CH_3), 1,90 с (6H, CH_3), 1,87 м (2H, NCCCH_2CN).

Масс-спектр: m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 238(44), 138(19), 126(100), 113(85), 104(28), 98(97), 84(53), 70(73), 43(40).

ИК (KBr): 1612, 1568, 1520, 752, 724 cm^{-1} .

5,10-Диаза-4,11-диметилтетрадека-3,11-диен-2,13-дион (3). К 4,4 г (50 ммоль) 1,4-диаминобутана при перемешивании и охлаждении прибавляли 10 г (100 ммоль) ацетилацетона и оставляли на 10 ч при обычной температуре. Образующиеся кристаллы отфильтровывали и перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получили 21 г (85%) **3**, т.пл. 86–88°C.

Спектр ЯМР ^1H , δ , М.Д.: 10,9 с (2H, NH), 4,95 с (4H, CH_2), 3,28 q (4H, NCH_2C), 1,98 с (6H, CH_3), 1,92 с (6H, CH_3), 1,7 м (4H, CCH_2C).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 252(10), 153(89), 138(26), 136(31), 112(25), 110(100), 98(34), 83(87), 70(87), 55(48), 43(44).

5,12-Диаза-4,13-диметилгексадека-3,13-диен-2,15-дион (4). К 5,8 г (50 ммоль) 1,6-диаминогексана при перемешивании и охлаждении прибавляли 10 г (100 ммоль) ацетилацетона и оставляли на 12 ч при обычной температуре.

Образующийся продукт отфильтровывали и перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получили 12,88 г (92%) **4**, т.пл. 75–77°C.

Спектр ЯМР ^1H , δ , М.Д.: 10,85 с (2H, NH), 4,92 с (4H, CH_2), 3,2 q (4H, NCH_2C), 1,96 с (6H, CH_3), 1,88 с (6H, CH_3), 1,6 м (4H, CCH_2C), 1,4 м (4H, CCH_2C).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 280(14), 262(8), 237(13), 180(100), 168(34), 154(15), 140(34), 138(68), 126(36), 112(40), 98(58), 83(54), 70(50), 55(75), 43(35).

3,5-Диметил-2,6-диазабицкло[5.4.0]индика-2,5,7,9,11-пентан (5). К раствору 1,08 г (10 ммоль) о-фенилендиамина в 15 мл изопропилового спирта добавляли 1 г (10 ммоль) ацетилацетона и нагревали при кипении 10 мин. Реакционную смесь упаривали, остаток обрабатывали горячим гексаном (4×10 мл), гексан отгоняли. Остаток перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получили 0,602 г (35%) **5**, т.пл. 130–131°C.

Спектр ЯМР ^1H , δ , М.Д.: 7,28 м, 7,19 м (4H, аромат.), 2,8 с (2H, CCH_2C), 2,3 с (6H, CH_3).

Масс-спектр: m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 172(100), 157(28), 130(44), 116(9), 103(15), 90(35), 76(21), 63(29), 51(11), 50(13), 43(16).

ИК (KBr): 3050, 1632, 780, 764, 752 cm^{-1} .

Этил 3-[2-(1-этоксипропан-2-ил)аминоэтиламино]бут-2-инолат (6). К раствору 2,6 г (20 ммоль) ацетоуксусного эфира добавляли 1,2 г (20 ммоль) этилиндиамина и нагревали 15 мин. После охлаждения, кристаллы отфильтровывали и перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Получали 3,56 г (33%) **6**, т.пл. 115–117°C.

Спектр ЯМР ^1H , δ , М.Д.: 8,6 с (2H, NH); 4,5 с (2H, CH); 4,1 q (4H, CH_2); 3,4 т (4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 1,9 с, 1,25 д (12H, CH_3).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 284(23), 239(31), 193(32), 155(69), 142(70), 114(18), 96(100), 82(53), 71(51), 68(40), 56(25), 55(44), 42(39).

ИК (KBr): 3296 (NH), 1604, 1652 ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

ЛИТЕРАТУРА:

1. Камара К., Кузнецов А. И. // Ученые записки МИТХТ, 2003, вып. 8, стр. 74–75.
2. Камара К., Кузнецов А. И. // Ученые записки МИТХТ, 2003, вып. 8, стр. 78–79.
3. Martell A. E., Belford R. L., Calvin M. // J. Inorg. Chem., 1955, 5, p.170.
4. Kwiatkowski E., Kwiatkowski M., // Inorg. Chim. Acta, 1984, 82, p.101 – 109.
5. Осинский С. П., Левитин И. Я., Сиган А. Л., и др. // Изв. Акад. Наук. Сер. Хим., 2003, №12, p.2495 – 2504.
6. Сиган А. Л., Сургай В. В., Цикалова М. В., Якубовская Р. И. // Рос. Хим. Журн., 1998, 42, p 128 – 139.
7. Costa G., Mestroni G., Tazuzher G., Stefani L. // J. Organomet. Chem., 1966, 6, p.18.