

На правах рукописи



СТАРЦЕВА
Ольга Михайловна

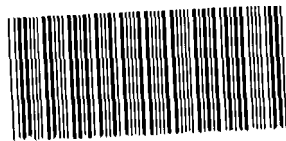
**НОВЫЕ ГИДРОФИЛИЗИРОВАННЫЕ И ДИМЕРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ
ХЛОРОФИЛЛА А С ФРАГМЕНТАМИ ОЛИГОЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ В
КАЧЕСТВЕ ГИДРОФИЛЬНОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ ИЛИ СПЕЙСЕРА**

02.00.03 – органическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1 АПР 2015

Иваново 2015



005566493

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент

Белых Дмитрий Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Березин Дмитрий Борисович
ФГБОУ ВПО «Ивановский
государственный химико-
технологический университет»,
г. Иваново

кандидат химических наук, старший науч-
ный сотрудник

Тюрин Владимир Сергеевич
ФГБУН «Институт физической
химии и электрохимии
им. А. Н. Фрумкина РАН»,
г. Москва

Ведущая организация:


ФГБОУ ВПО Ивановский
государственный университет

Защита диссертации состоится 27 апреля 2015 г в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.063.01 в Ивановском государственном химико-технологическом университете по адресу: 153000, г. Иваново, пр. Шереметевский, д. 7. Контакты. тел. (факс) (4932) 32-54-33, e-mail dissovet@isuct.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ивановского государственного химико-технологического университета по адресу: 153000, г. Иваново, Шереметевский пр., д. 7 или на сайте www.isuct.ru.

Автореферат разослан 16 марта 2015 г.

Ученый секретарь, д.х.н.



Данилова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Производные хлорофилла *a* интенсивно исследуются в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ) в различных областях медицины (онкология, отоларингология, офтальмология, хирургия, лечение грибковых заболеваний). Некоторые из них уже нашли применение в клинической практике. Придание молекуле хлорофилла *a* амфифильных свойств во многих случаях способствует усилению фотодинамического действия за счет более эффективного взаимодействия ФС с клеточными мембранами, что повышает результативность ФДТ. Учитывая, что порфириновый макроцикл является гидрофобной частью молекулы, представляет интерес внедрение на периферию макроцикла гидрофильных фрагментов, в качестве которых нами были использованы фрагменты олигоэтиленгликолей с числом этиленгликольных звеньев от двух до шести. Эти олигоэфиры представляют собой растворимые в воде соединения, молекулы которых имеют значительное количество центров, обуславливающих эффективную гидратацию при их растворении в воде. В связи с этим наличие таких фрагментов и их количество в молекуле способствует ее гидратации и, тем самым, повышает гидрофильность соединения. Кроме того, наличие фрагмента олигоэтиленгликоля способствует межмолекулярным взаимодействиям, обусловленным водородными связями. Длина полиэфирной цепочки, положение в макроцикле и количество этих фрагментов должны оказывать влияние на гидрофильность соединения, поэтому, внедряя такие фрагменты, можно изменять гидрофильные свойства получаемых производных. В литературе содержатся отрывочные сведения о подобных производных, включающих фрагменты триэтиленгликоля. В то же время систематических исследований влияния строения таких соединений на их гидрофильность проведено не было, поэтому синтез и исследование хлорофилов с полиэфирными фрагментами, отличающихся длиной цепочки, ее положением в макроцикле и количеством олигоэтиленгликольных фрагментов представляет большой интерес. Дополнительная гидрофилизация может быть достигнута за счет внедрения в молекулу катионных заместителей. Кроме того, наличие катионных групп может привести к новым биологическим свойствам. Поэтому разработка способов внедрения катионных групп в молекулы подобных производных является актуальной задачей. Известно, что димерные хлорофины являются активными ФС для ФДТ онкологических заболеваний. Активность этих соединений в значительной степени зависит от длины и природы спейсера между макроциклами, поэтому синтез и изучение димерных хлорофилов с олигоэфирными спейсерами представляет большой интерес. Таким образом, разработка методов синтеза и химической модификации гидрофилизированных и димерных производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей различной длины в качестве гидрофильной части молекулы или спейсера между макроциклами, изучение свойств этих соединений представляют интерес с точки зрения развития химии фито-хлорофилов и получения новых биологически активных соединений и, поэтому, является актуальной задачей.

Целью настоящей работы является синтез, химическая модификация и исследование свойств гидрофилизированных и димерных производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей различной длины в качестве гидрофильной части молекулы или спейсера между макроциклами.

8

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Изучение перэтерификации сложноэфирных и этерификации карбоксильных групп производных хлорофилла *a* действием ди-, три-, тетра-, пента-, гексаэтиленгликолей, сти мулированных различными катализаторами и «активирующими агентами».
2. Синтез производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей различной длины в качестве гидрофильной части молекулы, отличающихся длиной олигоэтиленгли- кольной цепочки, ее положением в хлориновом макроцикле, а так же строением хлорино- вого макроцикла и количеством фрагментов олигоэтиленгликолей на его периферии.
3. Синтез дважды аминотетилированных производных хлорина e_6 с олигоэтиленгли- кольными фрагментами и дикатионных хлоринов на их основе.
4. Синтез димерных производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей различной длины в качестве спейсера между макроциклами с использованием реакции пе- реэтерификации сложноэфирной группы экзоцикла с дальнейшей модификации получен- ных производных.
5. Изучение влияния структуры полученных соединений на их гидрофильность и ци- тотоксичность.

Научная новизна. Разработаны новые способы синтеза производных хлорофилла *a* с одним и двумя фрагментами олигоэтиленгликолей, основанные на перэтерификации сложноэфирных групп производных хлорофилла *a*, а так же различии в реакционной спо- собности сложноэфирных групп экзоцикла и пропионатного заместителя в положении 17 метилфеофорбида *a*. Показано, что при действии на метилфеофорбид *a* ди-, три- и тетра- этиленгликолей в присутствии серной кислоты происходит перэтерификация сложно- эфирной группы заместителя в положении 17, а сложноэфирная группа в положении 13(2) экзоцикла в реакцию не вступает. С применением разработанных способов синтезирован ряд новых амфифильных хлоринов с фрагментами олигоэтиленгликолей в качестве поляр- ной части, отличающиеся длиной полиэфирной цепочки (2-6 звеньев), положением поляр- ного фрагмента в макроцикле и строением макроциклической части, а так же ряд форби- новых и хлориновых производных хлорофилла *a* с двумя фрагментами олигоэтиленглико- лей. На основе данных о хроматографической подвижности полученных производных в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ показано, что внедрение олигоэтиленгликольного фрагмента (как первого, так и второго) значительно увеличивает гидрофильность молеку- лы в целом. Из структурных факторов наиболее сильно влияет наличие или отсутствие эк- зоцикла (размыкание экзоцикла приводит при одинаковой длине полиэфирной цепочки к уменьшению гидрофобности), а так же положение полиэфирного фрагмента (увеличение длины спейсера между фрагментом олигоэтиленгликоля и макроциклом приводит к повы- шению гидрофильности). Удлинение полиэфирной цепочки не приводит к заметному уве- личению гидрофильности. Аминотетилированием винильной группы олигоэтиленгли- кольных производных хлорина e_6 действием бис(N,N-диметиламино)метана с последую- щей кватернизацией диметиламиногрупп полученных дважды аминотетилированных про- изводных действием йодистого метила синтезирована серия не описанных ранее дикати- онных хлоринов с фрагментами олигоэтиленгликолей различной длины. Синтезированы новые димерные хлорины с олигоэтиленгликольными спейсерами различной длины.

Практическая значимость. Предложен способ синтеза гидрофильных олигоэтиленгликольных производных хлорофилла *a*. Разработана методика синтеза форбин-форбиновых, хлорин-хлориновых и форбин-хлориновых димерных производных хлорофилла *a* с олигоэтиленгликольными мостиками. Предложен удобный способ синтеза эфиров производных хлорофилла *a* по положению 17, позволяющий получать форбины и хлорины с одним и двумя фрагментами олигоэтиленгликолей (по 13 и 17-положению в форбиновых и 15 и 17-положению в хлориновых производных). Синтезирована библиотека мономерных и димерных производных хлорофилла *a*, отличающихся гидрофильностью, зарядом молекулы и количеством макроциклов, исследование которых может выявить новые ФС для применения в различных областях медицины. Показано, что, внедрение фрагментов молекул олигоэтиленгликолей на периферию хлоринового макроцикла не приводит к заметному повышению токсичности соответствующих производных. Полученный результат может быть использован при разработке методов гидрофилизации производных природных порфиринов. Установлено, что темновая токсичность во всех случаях значительно снижается при переходе от мономерных хлоринов к димерным вне зависимости от строения макроциклов, объединенных в димер, поэтому димерные производные перспективны для дальнейшего исследования в качестве ФС.

Апробация работы и публикации. Основные материалы работы докладывались и обсуждались на VII всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев -2013» (Санкт-Петербург, 2013); II всероссийской молодежной научной конференции (с элементами научной школы) «Молодежь и наука на севере». (Сыктывкар, 2013); VIII всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Калининград, 2013); российском семинаре по химии порфиринов и их аналогов. XXXI научная сессия (Иваново, 2014); IV всероссийской молодежной научной конференции «Химия и технология растительных веществ и материалов» (Сыктывкар, 2014); IV всероссийской молодежной научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ» (Сыктывкар, 2014). По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и тезисы 8 докладов на всероссийских и международных конференциях.

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института химии Коми НЦ УрО РАН по темам «Органический синтез новых веществ и материалов; получение физиологически активных веществ на основе функциональных производных изопреноидов, липидов и природных порфиринов; асимметрический синтез. Научные основы химии и технологии комплексной переработки растительного сырья» (регистрационный № 01.2.00950779); Развитие методологии асимметрического органического синтеза; получение физиологически активных веществ на основе функциональных производных изопреноидов, порфиринов и гетероциклических соединений. Получение новых веществ и материалов, научные основы химии и технологии экологически безопасной комплексной переработки растительного сырья регистрационный № 01201255403). Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ «проект № 12-03-31302 мол_а», «проект № 14-03-01061 а» и программы «УМНИК» (2013).

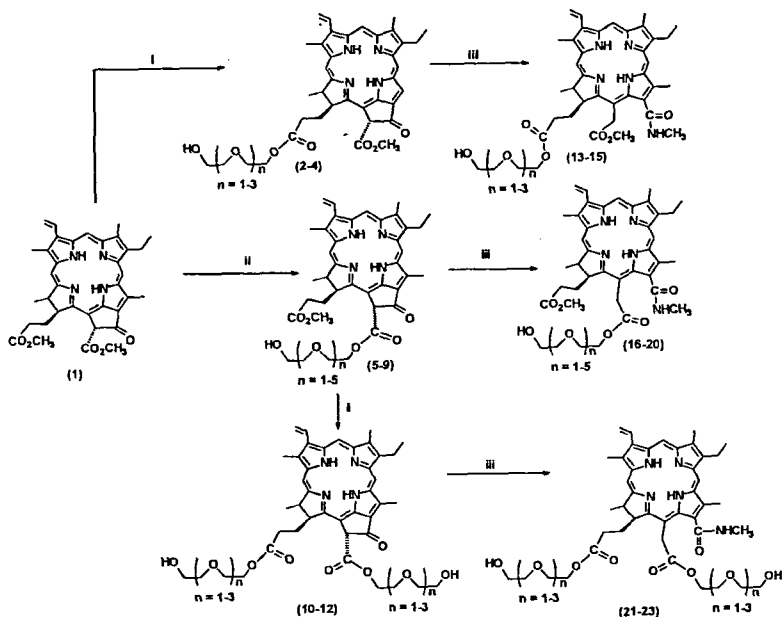
Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в постановке цели и задач исследования, планировании, выполнении эксперимента, интерпретации результатов спектральных исследований полученных соединений и обсуждении результатов. Подготовка соединений для оценки гидрофильности методом ВЭЖХ и биологических испытаний. Все описанные в работе эксперименты выполнены лично автором.

Объем и структура диссертации диссертационная работа изложена на 136 стр., содержит 24 рисунков, 56 схем и состоит из введения, 3-х глав, выводов и списка литературы из 126 наименований. В первой главе (литературный обзор) рассмотрены методы синтеза водорастворимых порфиринов, порфирины с гликольными заместителями, приведены реакции экзоцикла метилфеофорбида *a*, рассмотрены пути синтеза димерных порфиринов. Во второй главе приведено обсуждение полученных результатов. В третьей главе приведены методы получения соединений и их спектральные характеристики.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ДИССЕРТАЦИИ

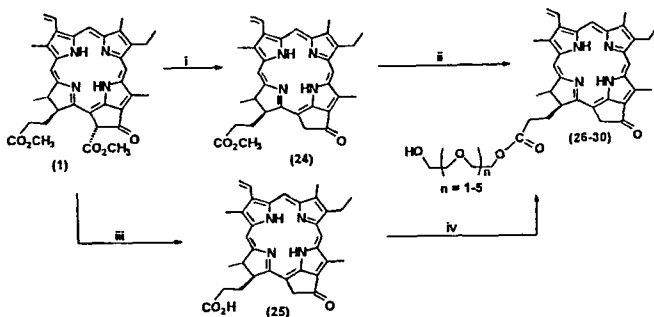
1. Получение производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей

Для внедрения на периферию хлорофиллового макроцикла фрагментов олигоэтиленгликолей (соединения (2-23, 26-30), схемы 1, 2) нами были использованы реакции перэтерификации сложноэфирных групп в положениях 17 и 13(2) (в условиях катализа кислотой и с использованием активации 2-хлор-N-метилпиридиний йодидом) и этерификации карбоксильной группы в положении 17. Переход от форбиновых производных к хлорофилловым осуществляли размыканием экзоцикла при действии метиламина (схема 1). Строение полученных соединений было подтверждено с использованием ИК, электронной (UV-Vis) и ЯМР ^1H спектроскопии, а так же масс-спектрометрии. Внедрение фрагмента олигоэтиленгликоля приводит к уменьшению хроматографической подвижности на нормальной фазе (ТСХ, Sorbfil) как по сравнению с исходными сложноэфирными, так и карбоксильными производными. В масс-спектрах (ESI) наблюдаются пики, соответствующие протонированным молекулярным ионам полученных соединений (2-23, 26-30), а также, во многих случаях, аддуктам с катионами натрия и калия. Фрагмент олигоэтиленгликоля проявляется в ИК спектре слабой полосой в области $2730\text{-}2750\text{ см}^{-1}$ соответствующей валентным колебаниям связи C-H метиленовой группы, соединенной с эфирным атомом кислорода. В спектре ЯМР ^1H олигоэтиленгликоль фрагменты проявляются в виде мультиплетов в областях 4.60-4.00 и 3.90-3.00 м.д., соответствующих протонам метиленовых групп при сложноэфирном, спиртовом и эфирном атомах кислорода. Перэтерификация сложноэфирной группы приводит к исчезновению в спектре ЯМР ^1H продукта синглета соответствующего метильного фрагмента, что позволяет отличить замещение метоксила в положениях 13(2) и 17 (рисунок 1).



$n = 1$ (2, 5, 10, 13, 16, 21); $n = 2$ (3, 6, 11, 14, 17, 22); $n = 3$ (4, 7, 12, 15, 18, 23);
 $n = 4$ (8, 19); $n = 5$ (9, 20)

Схема 1 – i: $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{OCH}_2\text{OH}$, H_2SO_4 (конц), комн. темп. 16-20 ч (2 (выход: 51%), 3 (46%), 4 (45%), 10 (42%), 11 (42%), 12 (27%)); ii: $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{OCH}_2\text{OH}$, 2-хлор-N-метилпиридиний йодид, 4-диметиламинопиридин, толуол, кипячение 1-3 ч (5 (57%), 6 (67%), 7 (50%), 8 (67%), 9 (47%)); iii: $\text{CH}_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$, ТГФ, комн. темп. 1-2 ч (13 (58%), 14 (16%), 15 (21%), 16 (60%), 17 (74%), 18 (62%), 19 (71%), 20 (57%), 21 (42%), 22 (46%), 23 (29%)).



$n = 1$ (26); $n = 2$ (27); $n = 3$ (28); $n = 4$ (29); $n = 5$ (30)

Схема 2 – i: коллидин, кипячение, 30-40 минут; ii: $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{OCH}_2\text{OH}$ ($n = 1-3$), H_2SO_4 (конц), комн. темп. 12-16 ч (26 (выход: 24%), 27 (29%), 28 (28%)); iii: $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ /ацетон; iv: $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{OCH}_2\text{OH}$ ($n = 4, 5$), 2-хлор-N-метилпиридиний йодид, 4-диметиламинопиридин, ТГФ, кипячение 1-2 ч (29 (36%), 30 (31%)).

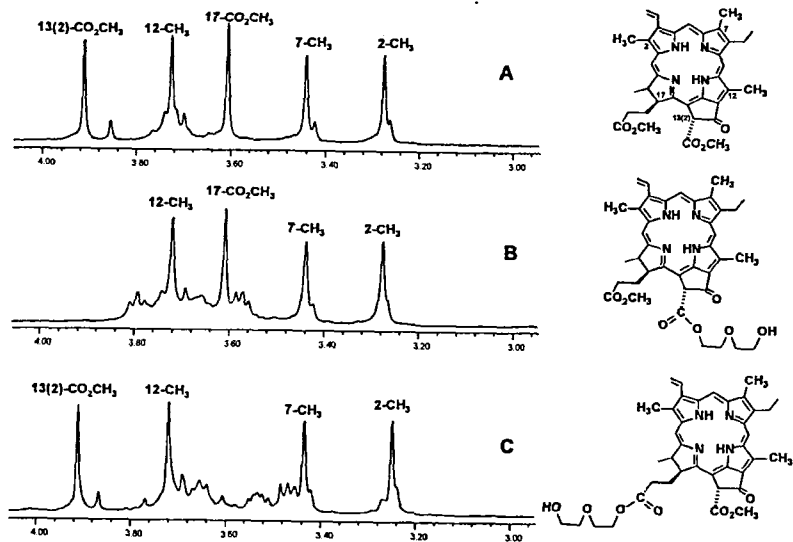


Рисунок 1. Спектр ЯМР ¹H метилфофорбида *a* (1) (A) и его диэтиленгликольных эфиров (5) (B) и (2) (C) (CDCl₃, 300 МГц, область 3.00-4.00 м.д.).

Химические сдвиги сигналов этих протонов в спектрах ЯМР ¹H метилфофорбида *a* (1) существенно отличаются друг от друга и, в то же время, слабо изменяются при изменении длины олигоэтиленгликольной цепочки, поэтому они могут служить надежным источником информации о направлении протекания реакции (см. рисунок 1, на котором в качестве примеров приведены спектры ЯМР ¹H метилфофорбида *a* (1) и его диэтиленгликольных эфиров (2) и (5), отличающихся друг от друга положением диэтиленгликольного фрагмента). Исследование всех полученных 13(2)-карбометоксильных форбиновых производных методом ЯМР ¹H показывает, что все они представляют собой смесь диастереомеров по положению 13(2) со значительным преобладанием 13(2)-R диастереомера.

Размыкание экзоцикла форбиновых производных проявляется в ИК и ЯМР спектрах полностью аналогично наблюдавшемуся на примере более простых производных. В ИК спектрах полученных производных хлорина *e*₆ (13-23) отсутствует полоса поглощения кето-группы в положении 13(1) при 1700 см⁻¹ и наблюдаются полосы поглощения амидной группы («амид-I» при 1650 см⁻¹ и «амид-II» при 1550 см⁻¹). В спектрах ЯМР ¹H соединений (13-23) отсутствует синглет в области 6.25-6.35 м.д., соответствующий протону в положении 13(2) экзоцикла, и наблюдаются сигналы протонов метиленовой группы заместителя в положении 15, образующегося при размыкании экзоцикла (дублеты АВ-системы в области 5.00-6.00 м.д.), а так же сигналы протонов метиламидной группы (уширенный однопротонный квартет или неразрешенный мультиплет, соответствующий протону NH и трехпротонный дублет, соответствующий метильному фрагменту метиламидной группы).

Получение эфиров по карбоксильной группе в положении 17 макроцикла с ди-, три- и тетраэтиленгликолями проводили действием избытка соответствующего диола на 17-метилловые эфиры в присутствии серной кислоты (схемы 1, 2). Ди-, три- и тетраэтиленгликоли выступали одновременно в качестве реагентов и растворителей. В случае производных (1, 24), растворимость которых в смеси олигоэтиленгликолей и серной кислоты мала, к реакционной смеси добавляли небольшое количество хлороформа до полного растворения исходного хлорина. В результате происходила перэтерификация сложноэфирной группы заместителя в положении 17 с образованием целевых продуктов. Перэтерификация сложноэфирной группы экзоцикла метилфеофорбида *a* (1) в этих условиях не происходит. Соответствующие производные были получены в случае пирофеофорбида *a* (24) (схема 2). Этот же активирующий агент был использован нами для синтеза 13(2)-эфиров метилфеофорбида *a* (5-9) с фрагментами ди-, три-, тетра-, пента- и гексаэтиленгликолей. Получение производных хлорина e_6 с фрагментами олигоэтиленгликолей в положении 15 (16-20) проводили действием метиламина на форбиновые производные (5-9) (схема 1). Аналогично могут быть получены производные хлорина e_6 с фрагментами олигоэтиленгликолей в положении 17 (13-15) (размыкание экзоцикла производных метилфеофорбида *a* (2-4) действием метиламина) (схема 1). Для получения форбиновых производных с двумя фрагментами олигоэтиленгликоля (10-12) использовали перэтерификацию сложноэфирной группы в положении 17 производных (5-9). Производные хлорина e_6 с двумя фрагментами олигоэтиленгликоля (21-23) могут быть синтезированы действием метиламина на форбиновые производные (10-12).

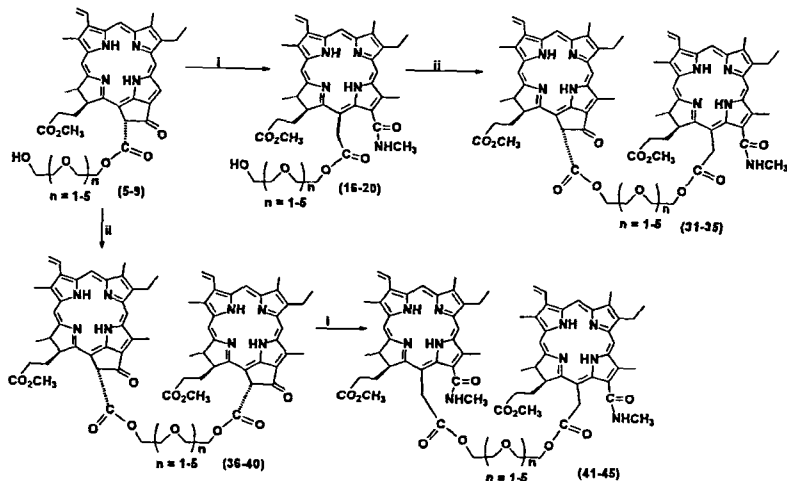
Отделение даже небольшого избытка диола от продукта реакции является самой трудоемкой частью процесса. Чем более полярно получаемое производное, тем труднее происходит его отделение. Так, например, была предпринята попытка синтезировать производные хлорины e_6 с двумя олигоэтиленгликольными фрагментами непосредственно из моноэфиров по положению 15 (16-20), но она не увенчалась успехом из-за невозможности отделения полученного производного от олигоэтиленгликоля. В связи с этим синтез олигоэтиленгликольных производных следует планировать таким образом, чтобы стадия, включающая взаимодействие с олигоэтиленгликолем, проводила к образованию, по возможности, максимально гидрофобного соединения и все последующие превращения с образованием более гидрофильных производных проводились без применения олигоэтиленгликолей. Так, при внедрении двух фрагментов олигоэтиленгликолей (соединения (21-23)) целесообразно сначала получить форбиновые производные (10-12), а затем проводить размыкание экзоцикла. Аналогично производные хлорина e_6 с фрагментами олигоэтиленгликолей в положении 17 (13-15) удобнее получать через соответствующие 17-эфиры феофорбида *a* (2-4).

2. Модификация хлоринов с фрагментами олигоэтиленгликолей

2.1 Димерные производные хлорофилла с олигоэтиленгликольными спейсерами

Длина и природа спейсера во многих случаях оказывает решающее влияние на свойства димерных хлоринов. По литературным данным, фрагменты олигоэтиленгликолей являются полифункциональными спейсерами, межмолекулярные взаимодействия с участием

которого позволяют регулировать свойства димерных макрогетероциклов. Нами получены димерные производные хлорофилла *a* на основе 13(2)-эфиров метилфеофорбида *a* с олигогликольными спейсерами (31-35). Построение димерных молекул было выполнено с помощью реакции перэтерификации сложноэфирной группы экзоцикла метилфеофорбида *a*. Хлорин-хлориновые димеры (41-45) были получены реакцией размыкания экзоциклов форбин-форбиновых димеров (36-40) под действием метиламина. Хлорин-форбиновые димеры получали при взаимодействии метилфеофорбида *a* (1) и производных хлорина e_6 с олигоэтиленгликольными фрагментами в положении 15 (16-20), стимулированном 2-хлор-N-метилпиридиний йодидом в присутствии 4-диметиламинопиридина в качестве основания.



$n = 1$ (5, 16, 31, 36, 41); $n = 2$ (6, 17, 32, 37, 42); $n = 3$ (7, 18, 33, 38, 43); $n = 4$ (8, 19, 34, 39, 44); $n = 5$ (9, 20, 35, 40, 45)

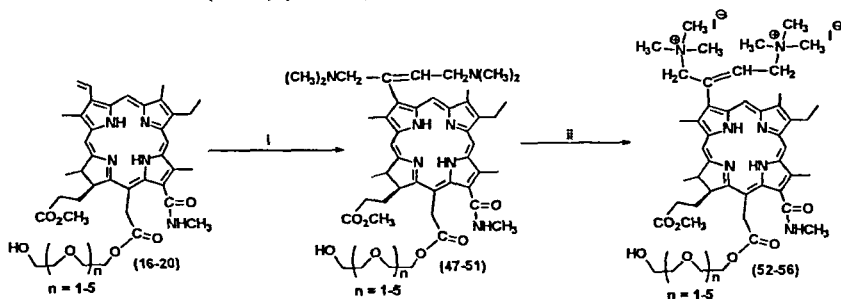
Схема 3 – i: $\text{CH}_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$, ТГФ, комн. темп. 30-60 мин (16 (выход: 60%), 17 (74%), 18 (62%), 19 (71%), 20 (57%), 41 (52%), 42 (50%), 43 (53%), 44 (59%), 45 (51%)); ii: (1)/толуол, 2-хлор-N-метилпиридиний йодид, 4-диметиламинопиридин, кипячение 1-3 ч (31 (70%), 32 (64%), 33 (67%), 34 (77%), 35 (64%), 36 (45%), 37 (42%), 38 (47%), 39 (40%), 40 (40%).

В масс-спектрах (MALDI) полученных соединений наблюдаются пики протонированных молекулярных ионов, значения m/z которых соответствует димерным молекулам. Макроциклы форбин-форбиновых (36-40) и хлорин-хлориновых (41-45) димеров магнитно эквивалентны, поэтому в спектрах ЯМР ^1H во всех случаях наблюдается только один набор сигналов. В то же время, относительная интенсивность сигналов протонов макроциклов и метиленовых групп фрагментов олигоэтиленгликолей форбин-форбиновых (36-40) и хлорин-хлориновых (41-45) димеров соответствует димерным производным. В спектрах ЯМР ^1H хлорин-хлориновых димеров (41-45), полученных действием метиламина на форбин-форбиновые димеры (36-40) отсутствуют синглеты протонов в положении 13(2) экзо-

циклов и появляется мультиплет АВ-системы метиленовых групп хлориновых макроциклов. В спектрах ЯМР ^1H хлорин-форбиновых димеров (31-35) наблюдаются сигналы хлоринового и форбинового фрагментов.

2.2 Аминометилирование винильной группы и синтез дикатионных производных

Известно, что взаимодействие 13-амидов хлорина e_6 с бис(N,N-диметиламино)метаном (46) приводит к внедрению в винильную группу двух диметиламинометильных заместителей и может быть использовано для синтеза предшественников дикатионных хлоринов. Аминометилирование винильной группы хлоринов (16-20) проводили при кратковременном (20-30 минут) кипячении (16-20) с избытком бис(N,N-диметиламино)метана (46) в смеси ТГФ и АсОН. В результате реакции образуются дважды аминометилированные по винильной группе 13-амиды хлорина e_6 с гликольными заместителями в положении 15 (47-51) (схема 4).



$n = 1$ (16, 47, 52); $n = 2$ (17, 48, 53); $n = 3$ (18, 49, 54); $n = 4$ (19, 50, 55); $n = 5$ (20, 51, 56)

Схема 4 – i: $((\text{CH}_3)_2\text{N})_2\text{CH}_2$, ТГФ/АсОН, кипячение, 20-30 мин (47 (выход: 50%), 48 (47%), 49 (45%), 50 (43%), 51 (51%)); ii: CH_3I , ТГФ, комн. темп., 60 мин (выходы количественные).

В спектре ЯМР ^1H полученных соединений (47-51), по сравнению с исходными (16-20) отсутствуют сигналы двух из трех протонов винильной группы, что свидетельствует о двукратном замещении в винильной группе. В масс-спектре аминометилированных производных хлорина e_6 с олигоэтиленгликольными фрагментами (47-51) наблюдаются пики $(\text{MH}+2\text{H})^+$.

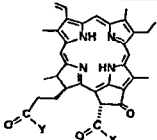
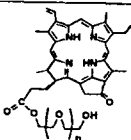
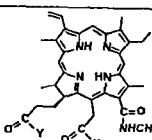
Последующая кватернизация аминогрупп дважды аминометилированного производных хлоринов e_6 (47-51) под действием йодистого метила (схема 4), позволяет получить серию дикатионных хлоринов (52-56) с количественными выходами. Внедрение двух катионных групп на периферию макроцикла позволяет улучшить растворимость гликольных производных хлорина e_6 (47-51) в воде. В спектре полученных производных происходит смещение сигналов метильных фрагментов аминометильных заместителей в область слабого поля, интенсивность сигналов замещенных групп увеличивается пропорционально увеличению метильных фрагментов. Полученные дважды аминометилированные производные представляют собой смесь *цис*- и *транс*-изомеров.

3. Исследование гидрофильности и цитотоксичности полученных производных

3.1 Оценка гидрофильности производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей на основании данных ВЭЖХ

Для оценки гидрофильности биологически активных веществ используют характеристики их распределения между водной и «жировой» фазой, в настоящее время в качестве «жировой» фазы принято использовать октанол. Кроме того, было показано, что коэффициент распределения коррелирует с временами удерживания соединений при их хроматографировании на обращенной фазе. Из этого следует, что хроматографическая подвижность соединений на обращенной фазе может служить количественным критерием оценки гидрофильных свойств наряду с распределением между октанолом и водой: чем выше подвижность, тем больше гидрофильность исследованного соединения и чем больше разница во временах удерживания, тем сильнее отличается гидрофильность.

Таблица 1. Времена удерживания хлоринов с олигоэтиленгликольными фрагментами (Thermo Finnigan surveyor (PDA, колонка Hypersil C18 100x2/1 мм, градиентное элюирование (от смеси 1% водная трифторуксусная кислота – метанол (40:60 по объему) до чистого метанола за 50 мин, скорость потока 0.4 мл/мин). (*) – производные хлорофилла *a* без фрагмента олигоэтиленгликоля для сравнения.

n	 $Gl = OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OH$				 $Gl = OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OH$		
	X = Gl Y = OCH ₃	X = OCH ₃ Y = Gl	X = Y = = Gl		X = Gl Y = OCH ₃	X = OCH ₃ Y = Gl	X = Y = = Gl
	1	37.76 (5)	36.68 (2)		29.13 (10)	41.64 (26)	36.14 (16)
2	37.54 (6)	36.56 (3)	33.28 (11)	41.48 (27)	36.46 (17)	34.43 (14)	31.19 (22)
3	36.81 (7)	36.39 (4)	31.90 (12)	41.22 (28)	36.22 (18)	33.98 (15)	30.09 (23)
4	36.46 (8)			43.09 (29)	35.93 (19)		
5	36.58 (9)			40.74 (30)	36.12 (20)		
(*)	41.16 (1) метилфеофорбид <i>a</i>			45.92 (24) метилпиро- феофорбид <i>a</i>	40.96 (57) 13(1)-N-метиламид-15(2),17(3)- диметилового эфира хлорина <i>e</i> ₆		

Сопоставление хроматографических характеристик полученных в работе олигоэтиленгликольных производных (2-30) (таблица 1) позволяет отметить следующие особенности влияния структуры на гидрофильность полученных соединений. Внедрение олигоэтиленгликольного фрагмента (как первого, так и второго) существенно увеличивает гидрофильность молекулы в целом, однако удлинение полиэфирной цепочки не приводит к заметному увеличению гидрофильности. Значительно сильнее на гидрофильность влияет наличие/отсутствие экзоцикла и положение олигоэтиленгликольного фрагмента в макроцикле. Переход от форбиновых производных к хлориновым приводит, при прочих равных ус-

ловнях (длина олигоэтиленгликольной цепочки и количество одинаковых олигоэтиленгликольных заместителей), к существенному повышению гидрофильности соединения. Так, переход от 13(2)-гликольных производных (5-9) к соответствующим хлоринам (16-20) приводит к уменьшению времени удерживания. Аналогично при переходе от форбиновых производных с фрагментом олигоэтиленгликоля в положении 17 (2-4) к хлоринам с таким же фрагментом в том же положении (13-15) время удерживания уменьшается. Полученные результаты можно объяснить тем, что удаление фрагмента олигоэтиленгликоля от макроцикла приводит к более эффективной гидратации этого фрагмента, что и обуславливает повышение гидрофильности. При прочих равных условиях изомерные производные с фрагментом олигоэтиленгликоля в положении 17 имеют большую хроматографическую подвижность, чем производные с гликольным фрагментом в положении 13(2) (в случае форбиновых производных) или в положении 15 (в случае хлоринов). Так, время удерживания производных хлорина e_6 с фрагментом олигоэтиленгликоля в положении 17 (13-15) меньше, чем у аналогичных производных с олигоэтиленгликольным фрагментом в положении 15 (5-7).

3.2 Влияние внедрения фрагмента олигоэтиленгликоля на токсичность ¹

Ковалентное связывание фрагментов олигоэтиленгликолей с фрагментами производных хлорофилла *a* может существенно изменить их биологическую активность. В связи с этим была выполнена оценка темновой цитотоксичности полученных производных хлорофилла с полиэфирными фрагментами на периферии макроцикла. Оказалось, что в целом влияние внедрения олигоэтиленгликольного фрагмента на темновую цитотоксичность неоднозначно и, как и в случае гидрофильных свойств, сильно зависит от строения макроцикла, положения полиэфирного заместителя, причем внедрение одного и того же олигоэтиленгликольного фрагмента в молекулы разных производных хлорофилла *a* может привести как к усилению, так и к ослаблению темновой цитотоксичности. Удлинение полиэфирной цепочки приводит к некоторому снижению токсичности в ряду 13(2)-эфиров метилфеофорбида *a* (5-9) и метилпирофеофорбида *a* по положению 17 (26-30). В случае метиламидных производных с полиэфирными фрагментами в положении 15 (16-20) производные с четным количеством звеньев в полиэфирной цепочке значительно токсичнее, чем производные с нечетным количеством звеньев. Внедрение второго полиэфирного фрагмента слабо влияет на токсичность соединения. Объединение в одной молекуле двух макроциклов приводит к резкому снижению токсичности вне зависимости от наличия экзоцикла в макроциклических фрагментах димерных производных. В целом, внедрение фрагментов молекул олигоэтиленгликолей на периферию хлоринового макроцикла не приводит к значительному повышению токсичности соответствующих производных.

¹ - оценка цитотоксичности полученных производных выполнена сотрудниками Института биологии Коми НЦ УрО РАН Пылиной Я.И. и Велегжаниновым И.О.

Основные результаты и выводы

1. Показано, что при действии на метилфеорбид *a* ди-, три- и тетраэтиленгликолей в присутствии серной кислоты происходит перэтерификация сложноэфирной группы заместителя в положении 17, а сложноэфирная группа в положении 13(2) экзоцикла в реакцию перэтерификации не вступает. Перэтерификация сложноэфирной группы экзоцикла может быть региоселективно осуществлена при использовании в качестве активирующего агента 2-хлор-N-метилпиридиний йодида в присутствии основания.
2. На основании данных о реакционной способности сложноэфирных групп метилфеорбида *a* в реакции перэтерификации предложены эффективные способы синтеза производных хлорофилла *a* с одним и двумя олигоэтиленгликольными фрагментами в положениях 13 и 17 макроциклов форбиновых производных и 15 и 17 – в макроциклах хлориновых производных.
3. Разработана методика синтеза форбин-форбиновых, хлорин-хлориновых и форбин-хлориновых димерных производных хлорофилла с олигоэтиленгликольными мостиками между макроциклами с числом звеньев от двух до шести.
4. Синтезирован ряд дикатионных хлоринов с фрагментами олигоэтиленгликолей различной длины путем аминотетирования винильной группы соответствующих производных хлорина e_6 бис(N,N-диметиламино)метаном с последующей кватернизацией аминогрупп полученных дважды аминотетированных производного хлорина e_6 действием йодистого метила.
5. Выполнена оценка гидрофильности олигоэтиленгликольных производных на основе данных о хроматографической подвижности полученных олигоэтиленгликольных производных в условиях обращеннофазовой ВЭЖХ. Показано, что внедрение олигоэтиленгликольного фрагмента (как первого, так и второго) значительно увеличивает гидрофильность молекулы в целом, в то время как удлинение полиэфирной цепочки не приводит к заметному увеличению гидрофильности. На гидрофильность молекулы олигоэтиленгликольных производных наибольшее влияние оказывает наличие или отсутствие экзоцикла (размыкание экзоцикла приводит при одинаковой длине полиэфирной цепочки к уменьшению гидрофобности), а так же положение полиэфирного фрагмента (увеличение длины спейсера между фрагментом олигоэтиленгликоля и макроциклом приводит к повышению гидрофильности).
6. Показано, что, несмотря на собственную токсичность олигомеров этиленгликоля, внедрение фрагментов этих молекул на периферию хлоринового макроцикла производных хлорофилла *a* не приводит к повышению токсичности соответствующих производных, несмотря на то, что олигоэтиленгликольные фрагменты связаны с макроциклом при помощи относительно лабильной сложноэфирной связи. Полученный результат может быть использован при разработке методов гидрофилизации производных природных порфиринов. Все полученные в работе мономерные и димерные производные перспективны с точки зрения дальнейшего исследования в качестве медицинских фотосенсибилизаторов.

Публикации по теме диссертации

1. Старцева О.М. Новые димерные производные хлорофилла *a* с фрагментами ди-, три- и тетраэтиленгликолей в качестве спейсеров между макроциклами / О.М. Старцева, Д.В. Белых, В.М. Шегера, Л.А. Тулаева // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т.38. – № 6. – С. 43-48.
2. Белых Д.В. Новые pH-независимые амфифильные производные хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей в качестве гидрофильной части: синтез и оценка гидрофильности / Д.В. Белых, О.М. Старцева, С.А. Патов // Макрогетероциклы. – 2014. – Т.7. – № 4. – С. 401-404.
3. Старцева (Смирнова) О.М. Синтез димерных хлоринов с олигоэтиленгликольными мостиками / О.М. Старцева (Смирнова), Д.В. Белых, В.М. Шегера, Л.А. Тулаева // Тез. докл. VII всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев -2013». – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 96.
4. Старцева (Смирнова) О.М. Синтез гидрофилизированных производных производных хлорина e_6 с олигоэтиленгликольными мостиками / О.М. Старцева (Смирнова), Д.В. Белых // Тез. докл. II всероссийской молодежной научной конференции (с элементами научной школы) «Молодежь и наука на севере». – Сыктывкар. – 2013. – Т.2. – С. 61.
5. Старцева (Смирнова) О.М. Димерные производные хлорофилла *a* с олигоэтиленгликольными мостиками между макроциклами / О.М. Старцева (Смирнова), Д.В. Белых, В.М. Шегера, Л.А. Тулаева // Тез. докл. VIII всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ». – Калининград. – 2013. – С. 204.
6. Старцева О.М. Амфифильные хлорины на основе хлорофилла *a* и олигоэтиленгликолей / О.М. Старцева, Д.В. Белых // Тез. докл. российского семинара по химии порфиринов и их аналогов. XXXI научная сессия. – Иваново. – 2014. – С. 34.
7. Старцева О.М. Оценка цитотоксичности производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей на периферии макроцикла / Я.И. Пылина, Д.М. Шадрин, И.О. Велегжанинов, О.М. Старцева, Д.В. Белых // Тез. докл. российского семинара по химии порфиринов и их аналогов. XXXI научная сессия. – Иваново. – 2014. – С. 82.
8. Старцева О.М. Дикатионные производные хлорина e_6 / О.М. Старцева, И.С. Тарабукина, С.А. Патов, Д.В. Белых // Тез. докл. IV всероссийской молодежной научной конференции «Химия и технология растительных веществ и материалов». – Сыктывкар. – 2014. – С. 133.
9. Старцева О.М. Синтез производных хлорофилла *a* с фрагментами олигоэтиленгликолей и оценка их цитотоксичности / О.М. Старцева, Я.И. Пылина, Д.М. Шадрин, И.О. Велегжанинов, Д.В. Белых // Тез. докл. IV всероссийской молодежной научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ». – Сыктывкар. – 2014. – С. 183.
10. Старцева О.М. Ассоциация амфифильных хлоринов на основе хлорофилла *a* и олигоэтиленгликолей в системе вода – этиловый спирт / О.В. Шухто, О.М. Старцева, Д.В. Белых // Тез. докл. IV всероссийской молодежной научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ». – Сыктывкар. – 2014. – С. 217.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.х.н., доц. Бельх Д.В. за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы; ведущему инженеру Зайнулиной Е.Н. (Лаборатория физико-химических методов исследования, Институт химии Коми НЦ УрО РАН) за оперативную и качественную съемку спектров ЯМР синтезированных соединений, н.с. Ипатовой Е.У. и м.н.с. Кривошапкиной Е.Ф. (Лаборатория физико-химических методов исследования, Институт химии Коми НЦ УрО РАН) за качественную съемку ИК и УФ спектров, коллективам Лаборатории органического синтеза и химии природных соединений (Институт химии КомиНЦ УрО РАН) и Кафедры органической химии (химико-биологический факультет СыктГУ) за полезное обсуждение полученных результатов.

Подписано в печать 19 февраля 2015 года. Тираж 100 экз. Заказ № 5.
Редакционно-издательский отдел Коми научного Центра УрО РАН
167982, ГСП, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 48.