



# ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ

ХИМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

CHEMICAL JOURNAL OF ARMENIA

Գլխավոր խմբագիր՝  
Գլխավոր խմբագրի խորհրդատու՝  
Գլխավոր խմբագրի տեղակալներ՝  
  
Պատասխանատու քարտուղար՝  
Գործավար՝

**Սաղյան Ա.Ս.  
Մանթաշյան Ա.Ն.  
Խառապյան Ս.Լ.  
Նովակիմյան Մ.Ժ.  
Սահակյան Ս.Ս.  
Գեոլչանյան Ա.Վ.**

### **ԽՍԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈՒԵՔԻԱ**

Արսենտև Ս.Դ. (պատասխանատու խմբագիր), Բաբայան Ս.Գ. (պատասխանատու խմբագիր), Դանագուլյան Գ.Ն. (պատասխանատու խմբագիր), Խաչատրյան Ն.Գ., Հայրապետյան Ս.Ս., Ղոչիկյան Ս.Վ., Մատնիշյան Ն.Ա. (պատասխանատու խմբագիր), Տոնոյան Ա.Ն., Փանոսյան Ն.Ա., Բելով Գ.Պ. (ՌԴ), Գևորգյան Վ.Ն. (ԱՄՆ), Դուրով Վ.Ա. (ՌԴ), Խոլկին Ա.Ի. (ՌԴ), Հարությունով Վ.Ս. (ՌԴ), Մալեն Վ.Ի. (ՌԴ), Բենիյան Ե. (Իտալիա):

|                                |                        |
|--------------------------------|------------------------|
| Главный редактор               | <b>Сагян А.С.</b>      |
| Консультант главного редактора | <b>Манташян А.А.</b>   |
| Заместители главного редактора | <b>Овакимян М.Ж.</b>   |
|                                | <b>Харатян С.Л.</b>    |
| Ответственный секретарь        | <b>Саакян С.С.</b>     |
| Делопроизводитель              | <b>Геолчаниян А.В.</b> |

### **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

Այրապետյան Ս.Մ., Արսենտև Ս.Դ. (ответственный редактор), Բաբայան Ս.Գ. (ответственный редактор), Դանագուլյան Գ.Ն. (ответственный редактор), Կոչիկյան Տ.Վ., Մատնիշյան Ա.Ա. (ответственный редактор), Փանոսյան Գ.Ա., Տոնոյան Ա.Ն., Խաչատրյան Ա.Գ., Արությունյան Վ.Ս. (Россия), Բելով Գ.Պ. (Россия), Գևորգյան Վ.Ն. (США), Դуров Վ.Ա. (Россия), Կեգեյան Ե. (Италия), Լալև Վ.Ի. (Россия), Խոլկին Ա.Ի. (Россия):

|                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| Editor-in-chief            | <b>Saghyan A.S.</b>     |
| Editor-in-chief Consultant | <b>Mantashyan A.A.</b>  |
| Deputy Editors             | <b>Kharatyan S.L.</b>   |
|                            | <b>Hovakimyan M.Zh.</b> |
| Responsible Secretary      | <b>Sahakyan S.S.</b>    |
| Secretary                  | <b>Geolchanyan A.V.</b> |

### **EDITORIAL BOARD**

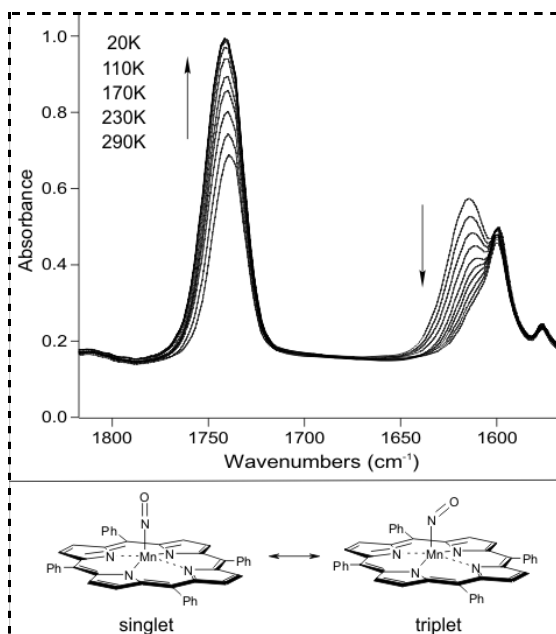
Arsentev S.D. (executive editor), Babayan S.G. (executive editor), Ghochikyan T.V., Danagulyan G.G. (executive editor), Hayrapetyan S.M., Khachatryan H.G., Matnishyan A.A. (executive editor), Panosyan H.A., Tonoyan A.H., Belov G.P. (Russia), Gevorgyan V.N. (USA), Durov V.A. (Russia), Harutyunov V.S. (Russia), Keheyan Ye. (Italy), Khol'kin A.I. (Russia), Maleev V.I. (Russia):

*“Химический журнал Армении” реферируется  
в “Chemical Abstracts” (США) и РЖХим (Россия).*

**www.flib.sci.am**

Spectral studies of nitrogen oxides interaction with heme models

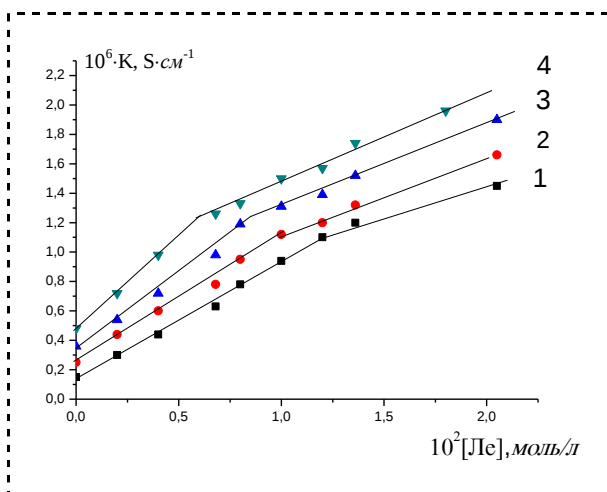
T. S. Kurtikyan



Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 455

Изучение физико-химических свойств этанольного раствора лецитина в присутствии диметилсульфоксида

Дж.Д. Григорян  
С. А. Апоян  
Ж. Н. Чобанян  
Л. Г. Мелик-Оганджян

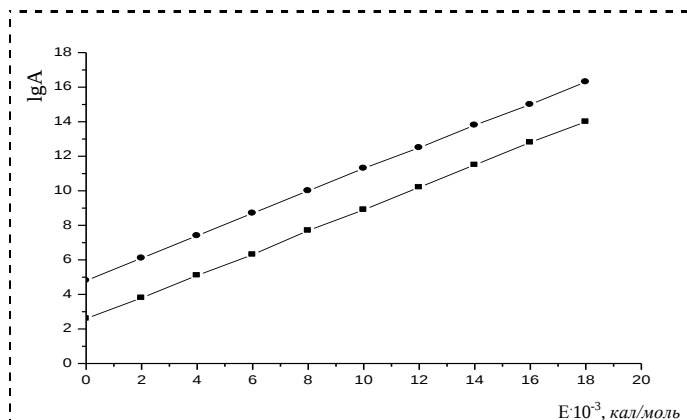


Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 480

## Экстракты некоторых лекарственных растений как антиоксиданты

Для константы  $k_7 \lg A_7 = (4.9 \pm 0.25) + (0.64 \pm 0.032)E_7$ ,  
а для  $k_{71} \lg A_{71} = (2.6 \pm 0.13) + (0.64 \pm 0.032)E_{71}$ .

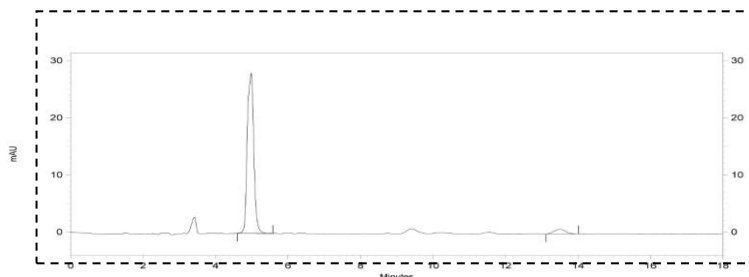
Л. Р. Варданян



Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 486

## A novel, simple and accurate high performance liquid chromatography-UV spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma

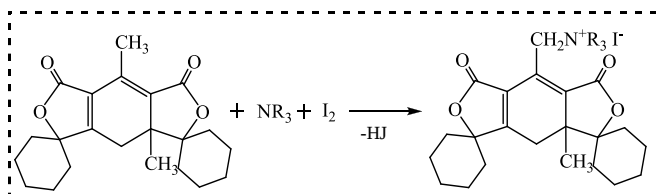
L. R. Ghochikyan



Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 496

## Синтез некоторых четвертичных аммониевых солей на базе 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофу-ро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона и их биологическая активность

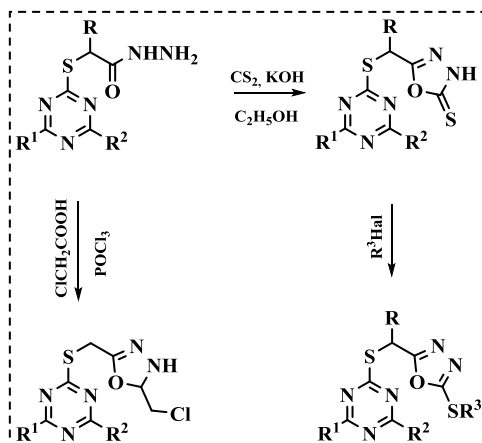
Л. Х. Галстян  
К. С. Аветисян  
З. Г. Алебян  
В. О. Топузьян



Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 507

**Синтез производных 5-([1,3,5]-триазилилтиоалкил)-  
[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тионов**

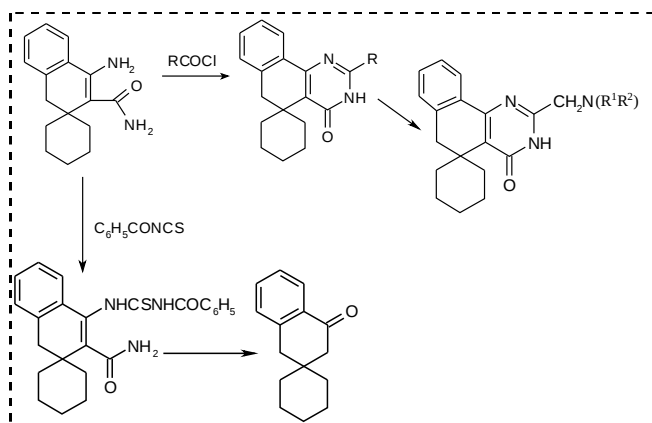
Э. Н. Амбарцумян,  
А. С. Ворсканян,  
А. А. Григорян,  
А. П. Енгоян



*Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 514*

**Синтез, превращения 4'-амино-1'Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-  
карбоксамида и изучение биологических свойств**

Н. П. Григорян  
А. С. Григорян  
Р. Г. Пароникян  
Р. С. Сукасян



*Хим. ж. Армении, 2015, т. 68, №4, с. 523*



## ОБЩАЯ И ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 947.973.733:543.22

### SPECTRAL STUDIES OF NITROGEN OXIDES INTERACTION WITH HEME MODELS

T. S. KURTIKYAN

The Scientific Technological Centre of Organic and  
Pharmaceutical Chemistry NAS RA  
Molecule Structure Research Centre  
26, Azatutyan Str., Yerevan, 0014, Armenia  
Fax (+37410) 282267 E-mail: kurto@netsys.am

Using FTIR and UV-vis spectroscopy comprehensive information was obtained regarding to interaction of nitrogen oxides with metalloporphyrin (MP) complexes of biologically important elements, such as, Fe, Co and Mn. Using differently labeled nitrogen oxides and DFT calculations the mode of coordination and electronic structure were reliably determined for the nitrosyl, nitrite and nitrate complexes of these MPs. Dependence of these parameters on the nature of metal has been clarified. Transformations of nitrogen oxides in the coordination sphere of MPs and their mechanisms were elucidated. The previously unknown 6-coordinate nitrosyl, nitrite and nitrate complexes of these MPs with *trans* electron donor ligands were obtained and spectrally characterized.

Fig. 9, tables 6, references 72.

### Introduction

The interaction of metalloporphyrins (MPs) with various nitrogen oxides is of enormous physiological importance. Nitrosyl, nitrite and nitrate MP complexes are involved in key processes in both the nitrogen cycle and mammalian physiology. Examples of the latter include neurotransmission, vasodilation and prevention of platelet aggregation. It is interesting that the ability of nitric oxide to induce vasodilation and prevent blood clotting is also utilized by several species of insects that feed upon the blood of the mammalian hosts.

Most of these processes proceed with the participation of heme-proteins. These are enzymes, the prosthetic group of which contains an iron-porphyrin ring. This

ring is usually immobilized by coordination with the electron donor atom of the protein's amino acid residue at the proximal site (see Figure 1 for myoglobin). The 6-th coordination distal site is usually occupied by a weak ligand, i.e. water, or remains free. Namely at this site the various transformations of interacting molecules occur.

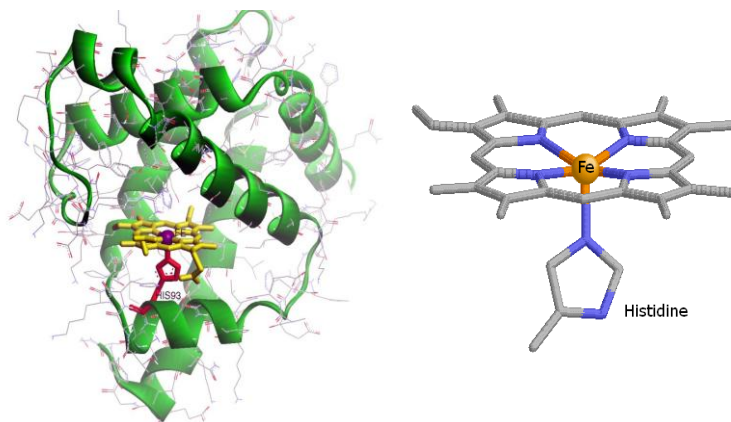


Fig. 1. Myoglobin structure.

Iron porphyrinato complexes are often used as models for heme proteins. In order to elucidate the processes taking place in the coordination sphere of metal, it is important to have physical methods to characterize effectively the nature of the intermediates formed. Vibrational spectroscopy is one such tool, and Raman and especially resonance Raman spectroscopy have provided valuable information regarding the reactions of heme models and proteins. In contrast, the data obtained by infrared spectroscopy, which is complementary, are often limited by the interference with the solvent bands. This problem can be overcome by using sublimed layers methodology elaborated in our laboratories.

It was shown that sublimed layers of MPs obtained by deposition on to low-temperature substrate are both amorphous and microporous [1]. They provide unimpeded diffusion of volatile reactants into the bulk of the layer and the species thus formed can be examined by FTIR and optical spectroscopy without the masking effects of the solvent. This methodology also provides an opportunity to investigate various gas-solid interactions at low-temperature conditions for characterization of unstable and intermediate species. By means of this methodology especially broad information has been obtained regarding to the interaction of various nitrogen oxides with the metallocomplexes of porphyrins containing biologically important metals, with Fe, Co and Mn among them.

In studies of heme proteins the technique of replacement of the neutral iron porphyrin prosthetic group with different MPs has been very useful [2] especially with Co-porphyrins that possess dioxygen binding ability, but contrary to EPR silent  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -porphyrins ( $d^6$ ) these can be studied by EPR due to single odd-electron configuration ( $d^7$ ). The EPR studies of Co heme proteins provided many important

insights for understanding the electronic and geometric structures which were not possible for the diamagnetic deoxy and oxy iron heme proteins [2, 3]. Mn-substituted heme proteins are also EPR-active ( $d^5$ ) and Mn prosthetic group were inserted into different apoproteins and EPR spectra and reactivity of the Mn components in the heme pocket were measured to evaluate the electronic structure of Mn-complexes [2, 4].

In this review we summarized the results obtained by our research group for the nitrogen oxides interaction with Fe-, Co- and Mn-porphyrins. Some of these results devoted to the reactions of nitrogen oxides with ferrous- and ferric-porphyrins were presented in the review published earlier [5]. For reactions with the nitrogen oxides, the use of isotopically labeled nitric oxide and nitrogen dioxide is very helpful for reliable assignments [5]. The earlier, detailed analysis of 5- and 6-coordinate Fe(TPP) (TPP - *meso*-tetraphenylporphyrinato dianion) complexes by Nakamoto and co-authors showed that the IR spectra display several bands indicative of the spin and oxidation states [6]. These additional data are very useful for the detailed information about the electronic structure of the species formed.

**Nitrosyl complexes of metalloporphyrins.** Nitric oxide (NO) has several well-established roles in mammalian biology closely tied to its interactions with metalloproteins, especially heme proteins [7]. A key example is the vasodilation triggered by the interaction of NO with the ferroheme center of soluble-guanylate cyclase leading to at least 200 fold increase in sGC activity [8]. This is due to NO binding with iron accompanied with the disruption of the Fe-Histidine bond (Fig. 1) and corresponding change of the enzyme conformation [9].

In the beginning of this century controversial data were published for the reaction of NO with simple ferrous heme models [10-13]. Some authors claimed that nitric oxide disproportionation reaction takes place leading to formation of the nitro-nitrosyl complex [10, 11] while the others [12, 13] have rejected this reaction pathway. This system was reexamined by using the sublimed layer technique and it was shown that in the similar experimental conditions Ru-porphyrins promote NO disproportionation while ferrous porphyrins do not [14]. It was shown later that in contrast to iron-analog manganese(II)-porphyrins promote NO disproportionation.

Low-temperature interaction of NO excess with sublimed layers of Mn(Por) resulted eventually in the formation of Mn(Por)( $\eta^1$ -ONO) and evolution of nitrous oxide  $N_2O$  [15, 16]. Using different Mn-porphyrins and isotopically labeled NO the mechanism of this reaction was clarified in details [16].

In the case of Fe-porphyrins the only intermediate detected at low temperatures was dinitrosyl complex that loses one of the axial ligands upon warming to room temperature (RT) resulting in the formation of the well-known mononitrosyl complex (Scheme 1) [17]. According to the DFT calculations in the dinitrosyl complex the nitrosyls are tilted in the same side [18], making the NO synphase stretching IR active, as is seen in the FTIR spectrum (Fig. 2, dashed line, IR band at about  $1775\text{ cm}^{-1}$ ). Recent studies showed [19] that for the activation of the soluble guanylate cyclase two equivalents of nitric oxide is necessary. This led to the

speculation that a proximal NO is responsible for histidine displacement, giving an intermediate 6-coordinate NO-Fe-NO complex. Our observation of the di-nitrosyl complex supports this point of view. An alternative hypothesis states that a second, non-heme binding site accounts for the second NO dependent activation process to give the fully active enzyme [20].

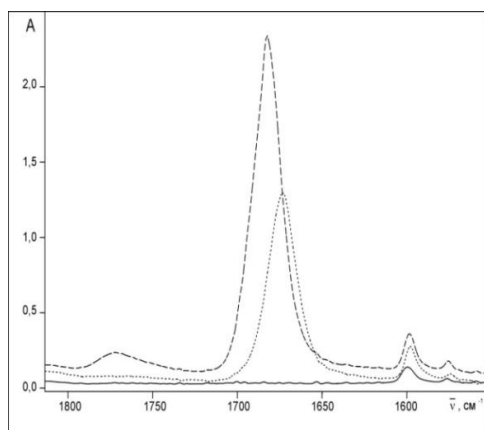


Fig. 2. — FeTPP ; ---- FeTPP(NO)<sub>2</sub>, 170 K; ..... FeTPP(NO), RT [17].

### Scheme 1

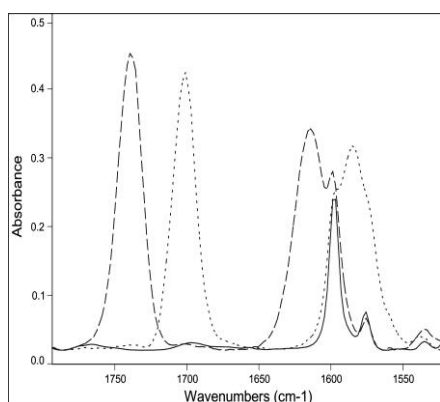
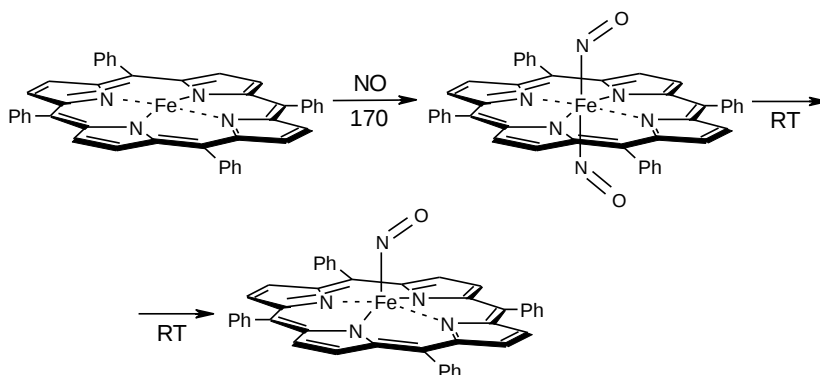


Fig. 3. FTIR spectra of Mn(TPP)(solid), Mn(TPP)(NO) (dashed) and Mn(TPP)(<sup>15</sup>NO) (dotted) in the range of  $\nu(\text{NO})$  [21].

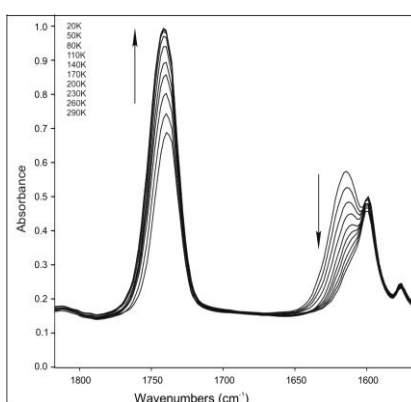
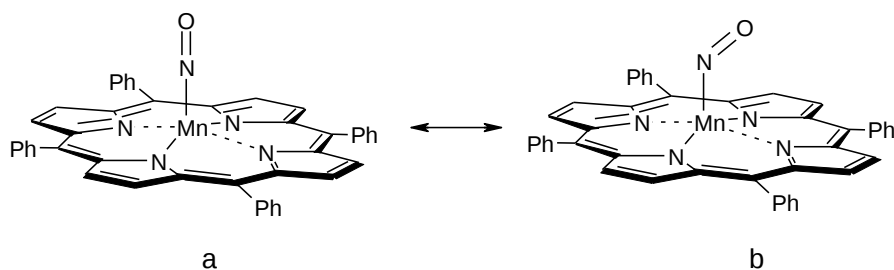


Fig. 4. Temperature dependence of the Mn(TPP)(NO) FTIR spectra [21].

Very interesting results were obtained in the course of the nitric oxide interaction with amorphous layers of Mn-porphyrins [21] leading to the formation of two isomeric nitrosyl complexes with the  $\nu(\text{NO})$  disposed at  $1739$  and  $1614\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3) reversibly interconverting with changes in temperature. Cooling the layers containing the nitrosyl complex(es) from  $290\text{ K}$  was accompanied with a decrease in intensity at  $1614\text{ cm}^{-1}$  and an increase at  $1739\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 4). At  $20\text{ K}$ , the spectrum is dominated by the latter band. This process is reversible; repeated cooling and warming of the sample gave identical results. From the temperature dependence of these FTIR band ratios, the enthalpy difference between the two species was calculated to be  $\sim 1\text{ kcal/mol}$ . DFT computations predict the existence of a linear nitrosyl Mn(TPP)(NO) complex with a singlet ground electronic state (Scheme 2a) and another state close in energy with a bent Mn-N-O geometry and a triplet electronic state (Scheme 2b). The isomers are in dynamic equilibrium and as the temperature is decreased, the second isomer almost completely passes to the linear species. Recently an unprecedented bent geometry of NO-binding with Mn(II) was detected in Mn-substituted horse heart myoglobin [22]. The authors attributed this to an H-bonding of  $\text{N}_\epsilon$  atom of the distal His64 residue with the N- and O-atoms of coordinated NO. It cannot be excluded that the ability of Mn-nitrosyl porphyrins to be bent in the intermediate spin state additionally contributes to the realization of the bent geometry. It would be of interest to know whether the distortion observed for the horse heart myoglobin is accompanied by a spin state change. It should be also stressed that this isomerism is inherent only to the amorphous samples. Crystallization, accompanying with the closer packing of the molecules in the layer, leads to the complete disappearance of the bent species.

Scheme 2



Since most of the heme proteins contain an axial electron donor ligand in the proximal site, the 6-coordinate nitrosyl complexes are of particular interest. Such complexes containing N-donor ligands in the *trans* axial position were characterized for iron and manganese porphyrins [23, 24]. For Co-porphyrins, however, the first 6-coordinate nitrosyl complexes with *trans* amino ligands were obtained only by the application of low-temperatures due to the thermal instability of such species [25]. Low-temperature interaction of nitrogen base ligands with layered Co(TTP)(NO) (TTP = *meso*-tetra-*p*-tolylporphyrinato dianion) as well as its toluene solution leads

to the formation of the first 6-coordinate species of the general formula (B)Co(TTP)(NO) (where B - piperidine and pyridine). The  $\nu(\text{NO})$  stretching bands of these species appear at lower frequencies in comparison with the 5-coordinate nitrosyl derivative and depend on the nature of the *trans* axial ligand (Table 1). Fairly stable at low-temperature conditions in the solid state, they slowly dissociate the nitrogen base ligands upon warming to restore the 5-coordinate nitrosyl complex Co(TTP)(NO).

Six-coordinate nitrosyl complexes with *trans* sulfur-containing ligand were also obtained and spectrally characterized [26]. The FTIR spectral changes observed for Co(TTP)(NO) sublimed layer in the range of  $\nu(\text{NO})$  stretching after introducing tetrahydrothiophene (THT) into cryostat at  $T = 120\text{ K}$  and slow warming till  $170\text{ K}$  are presented in Fig. 5.

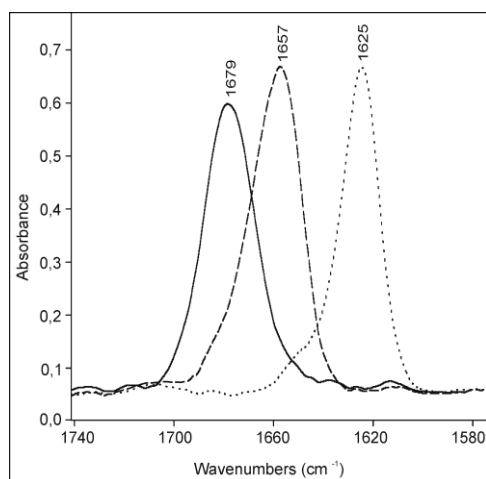


Fig. 5. FTIR spectra at  $170\text{ K}$  of sublimed layers containing Co(TTP)(NO) (solid line), Co(TTP)(THT)(NO) (dashed line) and Co(TTP)(THT)( $^{15}\text{NO}$ ) (dotted line) [27].

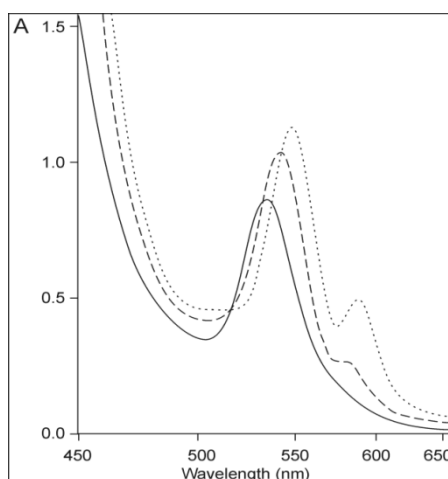


Fig. 6. UV-visible spectra at  $170\text{ K}$  of sublimed layers containing Co(TTP) (solid line) Co(TTP)(NO) (dashed line) and (DMS)Co(TTP)(NO) (dotted line) [27].

The UV-visible spectrum of the layered Co(TTP) also undergo noticeable changes in the course of sequential interaction with NO and sulfur-containing ligands. As seen in Fig. 6 the single band of Co(TTP) in the visible range at  $533\text{ nm}$  shifts to  $542\text{ nm}$  and displays a shoulder at  $578\text{ nm}$  upon the formation of the nitrosyl complex Co(TTP)(NO). Upon low-temperature interaction with DMS this band undergoes further high frequency shift to  $548\text{ nm}$  ( $549\text{ nm}$  for THT) and a second less intense band grows at  $587\text{ nm}$  ( $589\text{ nm}$  for THT). The spectra were recorded after the FTIR spectra of the same samples first demonstrated the formation of the Co(TTP)(NO) (dashed line) then a species with the complete shifting of  $\nu(\text{NO})$  to the lower frequency range (dotted line).

The equilibrium constants and enthalpies of the formation of these new species are determined and presented in Table 1.

Table 1

**FTIR, UV-Visible Data and Thermodynamic Parameters for 5- and 6-Coordinate Nitrosyl Complexes of Co(TTP) with Trans N- and S-donor Ligands [25, 26]. In parenthesis data for  $^{15}\text{NO}$  isotopomer are given.**

|                                                     | Co(TTP)<br>(NO) | (Pip)Co(TTP)<br>(NO) | (Py)Co(TTP)<br>(NO) | (DMS)Co(TTP)<br>(NO) | (THT)Co(TTP)<br>(NO) |
|-----------------------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| $\nu(\text{NO}), \text{cm}^{-1}$                    | 1680 (1650)     | 1650 (1621)          | 1643 (1615)         | 1661 (1633)          | 1658 (1629)          |
| $\Delta\nu(\text{NO})$                              |                 | 30 (29)              | 37 (35)             | 19 (17)              | 22 (21)              |
| $\lambda_{\text{max}}, \text{nm}$                   | 542             | 545                  | 546                 | 427, 546, 585        | 429, 545, 584        |
| $K_{298}, \text{M}^{-1}$                            |                 | 0,45                 | 0,2                 | $\sim 0.012$         | $\sim 0.007$         |
| $\Delta H^\circ, \text{kcal/mol}$                   |                 | $-6 \pm 0,4$         | $-5 \pm 0,4$        | –                    | $-4.72 \pm 0.4$      |
| $\Delta S^\circ, \text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ |                 | $-22 \pm 2$          | $-20 \pm 2$         | –                    | $-30, 23 \pm 4$      |
| $\Delta G^\circ, \text{kcal/mol}$                   |                 | $+0,56 \pm 0,5$      | $+0,596 \pm 0,6$    | –                    | $+4,28 \pm 0,5$      |

The data represented in Table 1 show that for 6-coordinate Co-porphyrin nitrosyls both the values of  $\nu(\text{NO})$  shifts and equilibrium constants are larger for the N-donor *trans* ligands than for the S-donors. These complexes are very unstable and can be observed only at low-temperatures both in the solid state and solutions. This observation however implicates the potential ability of N- and S-donor-ligated cobalt hemoglobin, cobalt myoglobin and cobalt cytochrome *c* for momentary binding of external NO.

Many heme proteins contain amino acid residues with sulfur and oxygen electron donor atoms as a proximal ligand. Therefore it was of interest to investigate whether 6-coordinate nitrosyl complexes of ferrous porphyrins with this type of axial ligation can be formed. The interaction of the S- and O-donor ligands tetrahydrothiophen (THT) and tetrahydrofuran (THF) with ferrous nitrosyl complex  $\text{Fe}(\text{TTP})(\text{NO})$  was studied at various temperatures both in solid state and solution using electronic and infrared absorption spectroscopy. Upon addition of these ligands into a cryostat containing the sublimed layers of  $\text{Fe}(\text{TTP})(\text{NO})$ , no complex formation was detected at RT. However, upon decreasing the temperature, spectral changes were observed that are consistent with ligand binding in axial position *trans* to the NO (the proximal site) and formation of the six-coordinate adducts [27]. Analogous behavior was observed in solution. In both media, the 6-coordinate adducts are stable only at low temperature and dissociate to the 5-coordinate nitrosyl complexes upon warming. The NO stretching frequencies of the 6-coordinate thioether and ether complexes were recorded and the binding constants for the weak bonding of proximal THF and THT ligands were determined from the spectral changes. These parameters are compared with those obtained for the N-donor ligand pyrrolidine. The spectral and thermodynamic data of such complexes are presented in Table 2.

Table 2

**Spectral data and thermodynamic parameters for the ferrous nitrosyl complex Fe(TTP)(NO) and the corresponding 6-coordinate adducts [27].**  
**In parenthesis data for  $^{15}\text{NO}$  isotopomer are given.**

|                                                               | Fe(TTP)(NO) | Fe(TTP)(THF)(NO)  | Fe(TTP)(THT)(NO)  | Fe(TTP)(Pyrr)(NO) |
|---------------------------------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $\nu(\text{NO}) \text{ (cm}^{-1}\text{)}$                     | 1676 (1645) | 1651(1626)        | 1648(1622)        | 1636(1605)        |
| $\Delta\nu(\text{NO}) \text{ (cm}^{-1}\text{)}$               | –           | 25(19)            | 28(23)            | 40(40)            |
| $\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}$                           | 409         | 425               | 427               | 427               |
| $K_{298} \text{ (M}^{-1}\text{)}$                             |             | $0.014 \pm 0.001$ | $0.038 \pm 0.002$ | $38 \pm 0.2$      |
| $\Delta H^{\circ} \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$             |             | $-2.2 \pm 0.2$    | $-2.0 \pm 0.2$    | $-9.3 \pm 0.7$    |
| $\Delta S^{\circ} \text{ (cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}\text{)}$ |             | $-16 \pm 2$       | $-13 \pm 2$       | $-24 \pm 3$       |
| $\Delta G^{\circ} \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$             |             | $+2.5 \pm 0.2$    | $+1.9 \pm 0.2$    | $-2.2 \pm 0.2$    |

Although nitrosyl complexes with *trans* S- and O-donor ligands are thermally unstable, the results of this study imply that such species may be formed in heme proteins with proximal S- and O-containing ligands as intermediates. The data presented in Table 2 show that both the values of the  $\nu(\text{NO})$  shifts and the equilibrium constants are larger for the N-donor *trans* ligands when compared to those of the S-donors. The same pattern was observed for the 6-coordinate Coporphyrin nitrosyls (Table 1).

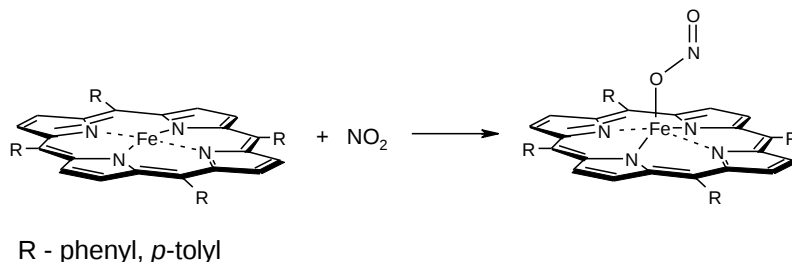
**Nitrite complexes of metalloporphyrins.** The roles of nitrogen dioxide ( $\text{NO}_2$ ) and of nitrite ion ( $\text{NO}_2^-$ ) in mammalian biology are hard to overestimate [28-32].  $\text{NO}_2$  is a strong oxidant and nitrating species that initiates destructive pathways in living systems [28], and several disease states have been suggested to be connected with exogenously and endogenously formed  $\text{NO}_2$  [29, 30]. Likely endogenous sources of  $\text{NO}_2$  are the reactions of nitric oxide (NO) with oxyglobins and with superoxide ion ( $\text{O}_2^-$ ) leading to coordinated and free peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), subsequent decay of which afford both nitrate ion and  $\text{NO}_2$  [32]. Furthermore, there is increasing evidence that  $\text{NO}_2$  may also be formed *via* enzymatic pathways with participation of heme peroxidases [28]. Nitrogen dioxide has also been shown to be a product of the reaction of NO and nitrate as mediated by a heme center [33]. With regard to nitrite, the  $\text{NO}_2^-$  ion is ubiquitous in mammalian tissues and fluids and the largest reservoir of accessible NO equivalents in the cardiovascular system [31, 34]. Recent studies have suggested that  $\text{NO}_2^-$  itself is a vasodilator or forms the known vasodilator NO via reaction with hemes [35-38] and has been proposed as a therapeutic agent under hypoxic ischemia conditions [39, 40].

The ambidentate nitrite ion can coordinate to metals either at the oxygen to give nitrito or at the nitrogen to give nitro complexes [41]. A third potential coordination mode involving bidentate binding of both oxygens to the metal is unknown for MPs and related metalloproteins.

By interaction of small increments of nitrogen dioxide with Fe-porphyrins amorphous layers the first 5-coordinate nitrite complexes were obtained. The FTIR

and optical spectral data indicate the coordination of nitrite through the oxygen atom and the high-spin state of the metal [42] (Scheme3).

**Scheme 3**



Such 5-coordinate O-nitrito complexes have repeatedly been postulated as intermediates in iron-porphyrins reactions with  $\text{NO}_x$  species, but before the publication of Kurtikyan and Ford [42] the elusive O-nitrito complex had never been identified. In heme models and hemeproteins the nitrite group in 6-coordinate complexes is usually bound via the nitrogen atom [23]. However from these data and consequent DFT calculations [43] performed for the 5-coordinate complex in different spin states it is seen that the O-bound isomer has lower energy (Table 3).

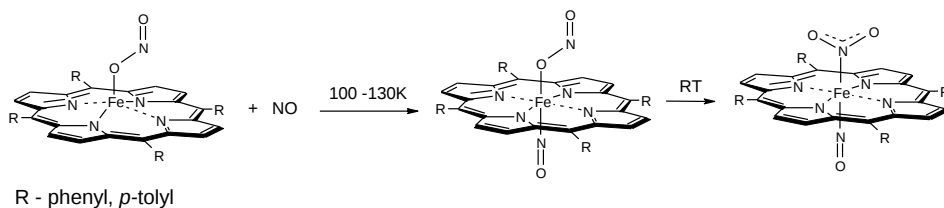
*Table 3*

**Computed total energies for all spin states of the N-nitro  $\text{Fe(P)}(\eta^1\text{-NO}_2)$  and O-nitrito  $\text{Fe(P)}(\eta^1\text{-ONO})$  isomers of the  $\text{NO}_2$  adduct of the iron(III) porphyrinato complex [43]**

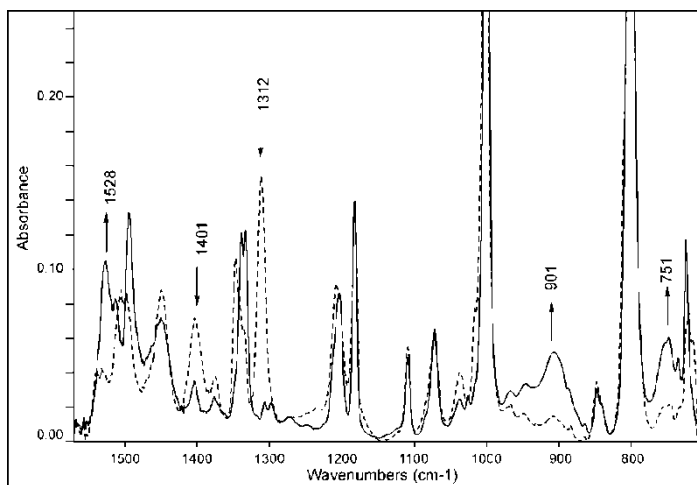
| Complex                                           | Total Energy, au | $\Delta E$ , au | $\Delta E$ , kJ/mole | HOMO eV | LUMO eV | Dipole Moment (Db) |
|---------------------------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|---------|---------|--------------------|
| $^2\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{NO}_2)$ | -1316.99793      | 0.00029         | 0.8                  | -5.44   | -2.95   | 2.99               |
| $^4\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{NO}_2)$ | -1316.99466      | 0.00356         | 9.3                  | -5.34   | -2.44   | 4.03               |
| $^6\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{NO}_2)$ | -1316.98632      | 0.01190         | 32.2                 | -5.44   | -2.49   | 3.72               |
| $^2\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{ONO})$  | -1316.99236      | 0.00586         | 15.4                 | -5.49   | -2.76   | 3.87               |
| $^4\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{ONO})$  | -1316.99822      | 0.00000         | 0.0                  | -5.45   | -2.9    | 5.22               |
| $^6\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})(\text{ONO})$  | -1316.99584      | 0.00238         | 6.3                  | -5.48   | -2.5    | 4.07               |

As it will be shown below the 5-coordinate nitrito complexes can serve as a convenient entry for synthesis of the 6-coordinate species. For example, addition of NO to nitrito complex at low temperatures leads to the formation of a nitrito-nitrosyl complex that isomerizes to the known nitro-nitrosyl complex upon warming thus demonstrating that NO binding to  $\text{Fe(Por)}(\eta^1\text{-ONO})$  leads to concomitant nitrito ( $\eta^1\text{-ONO}$ ) to nitro ( $\eta^1\text{-NO}_2$ ) isomerization (Scheme 4).

### Scheme 4



Similarly the low temperature interaction of ammonia with the iron-porphyrin nitrito species leads to the formation of nitrito-ammonia complex [44]. Upon warming nitrito-nitro isomerization takes place as was in the case of the aforementioned NO ligand. At room temperature, the latter is stable only in the presence of excess  $\text{NH}_3$  ( $> 20 \text{ Torr}$ ). When instead this system was warmed up to RT under intense high vacuum pumping, the  $\text{Fe}(\text{TTP})(\text{NH}_3)(\text{NO}_2)$  underwent complete transformation to the initial nitrito complex  $\text{Fe}(\text{TTP})(\eta^1\text{-ONO})$  (Fig. 7). Hence, the loss of the *trans* ammine results in reverse linkage isomerization.

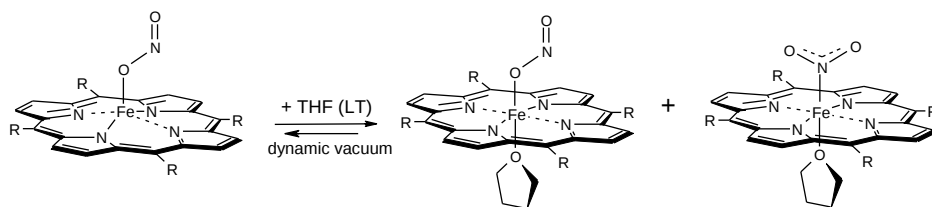


**Fig. 7.** FTIR spectra of ammine-nitro complex  $\text{Fe}(\text{TTP})(\text{NH}_3)(\text{NO}_2)$  (dashed line) after warming from 240 K to 293 K upon intense pumping. The bands of coordinated nitro group at 1401 and  $1312 \text{ cm}^{-1}$  disappear with concomitant growth of the bands at 1528, 901 and  $751 \text{ cm}^{-1}$  belonging to coordinated O-nitrito group in the 5-coordinate nitrito species  $\text{Fe}(\text{TTP})(\eta^1\text{-ONO})$  [44].

The interaction of a weak electronodonor ligand tetrahydrofuran (THF) with the nitrito complex led to an unexpected result. The FTIR and UV-vis spectra demonstrate that tetrahydrofuran reacts with the 5-coordinate iron(III)-porphyrin nitrito complex  $\text{Fe}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO})$  in low temperature layered solids to give two 6-coordinate THF complexes, O-nitrito and N-nitrito isomers  $\text{Fe}(\text{Por})(\text{THF})(\eta^1\text{-ONO})$  and  $\text{Fe}(\text{Por})(\text{THF})(\eta^1\text{-NO}_2)$ , respectively (Scheme 5). These products also differ in their apparent spin states; the nitrito isomer being in high-spin while the nitro is in

low-spin. Both are thermally unstable, and when the layers are warmed up in vacuum the initial  $\text{Fe}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO})$  is largely restored [45].

**Scheme 5**



R - phenyl, *p*-tolyl

The reaction of the stronger and less volatile electronodonor ligands (Py, 1-MeIm) with 5-coordinate nitrito complexes leads to formation of the 6-coordinate nitro complexes [44] that are stable at ambient conditions in solid state.

These data confirm that, for these ferriheme model complexes, the nitrite ligand is preferably bound via the O-coordination in the absence of an axial ligand but adopts the N-bonded configuration when the second axial site is occupied. Richter-Addo and co-workers have determined the crystal structures of nitrite ion complexes for human hemoglobin and horse heart myoglobin and found both to be nitrito species [46, 47]. The authors attributed this to the H-bonding of the  $\text{N}_\delta$  atom of the distal His64 residue with the N- and O-atoms of the coordinated nitrite. Sustaining this suggestion the H64V mutant of metMb, which has the distal histidine replaced by a valine, binds  $\text{NO}_2^-$  as a nitro complex [47]. These data confirm that the energy difference between nitrito and nitro species is small and subtle environment changes can give preference to one or the other coordination mode.

Low-temperature interaction of S-donor thioethers DMS and THT with 5-coordinate iron porphyrin O-nitrito complexes  $\text{Fe}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO})$  (Por - TPP and TTP) leads to the formation of the 6-coordinate nitro species  $(\text{R}_2\text{S})\text{Fe}(\text{Por})(\text{NO}_2)$  [48]. Hence, the coordination of the proximal S-donor ligand leads to nitrito  $\rightarrow$  nitro isomerization of the nitrite ligand. In the presence of gas phase  $\text{R}_2\text{S}$  donors these 6-coordinate complexes can be observed even at RT. In contrast to high spin 5-coordinate nitrito complexes, the 6-coordinate S-donor species are in the low spin state. DFT calculations for these 6-coordinate species give minimal energies for the low-spin doublet states for the nitro and nitrito isomers with the nitro isomer only 8 kJ/mol more stable than nitrito one. There are several indications of oxo-transfer reactivity of solid-state iron porphyrin nitrite system in the presence of gas phase  $\text{R}_2\text{S}$ : appearance of the iron-nitrosyl band in the layered solid and formation of the corresponding sulfoxides demonstrating by the FTIR and mass spectrometric measurements together with  $^{18}\text{O}$  isotope labeling experiments [48].

Via a room temperature reaction of small  $\text{NO}_2$  increments with the layered Coporphyrins the 5-coordinate nitro complexes  $\text{Co}(\text{Por})(\text{NO}_2)$  were obtained and characterized by FTIR and optical spectroscopy [49]. These 5-coordinate nitro

complexes reveal the oxygen atom transfer reaction from the coordinated nitro-group to free nitric oxide leading to formation of Co-porphyrin nitrosyls [50]. Using Co(Por)(NO<sub>2</sub>) species as a synthetic precursor to the 6-coordinate complexes, (L)Co(Por)(NO<sub>2</sub>) species (where L is N-, S- and O-donor ligands) have been obtained [51, 26, 52]. Complexes with N-donors are stable compounds both in the solid state and solutions, while complexes with S- and O-donors are stable in the solid state but partly decompose in non-coordinating solvent. The spectral characteristics of these species are summarized in Table 4.

The FTIR data summarized in Table 4 for the 6-coordinate nitro Fe(III) complexes and for the Co(III) analogs provide the basis for assigning vibrational frequencies to the coordinated nitro group, and these assignments are sustained by data for <sup>15</sup>NO<sub>2</sub> labeled isotopomers. The Table 4 also suggests an interesting correlation between the nature of the ligand *trans* to the nitro group and the difference between the frequencies of asymmetric and symmetric stretches,  $\Delta\nu = \nu_a(\text{NO}_2) - \nu_s(\text{NO}_2)$ . Within each series Fe(Por)(B)(NO<sub>2</sub>) (Por = TTP or TPP)  $\Delta\nu$  follows the order for the respective *trans* ligand: 1-MeIm < NH<sub>3</sub> < Py < S-donors ≤ THF << NO, while the cobalt(III) series Co(Por)(B)(NO<sub>2</sub>) follows an analogous order 1-MeIm < NH<sub>3</sub> < Py < S-donors < O-donors << empty coordination site (no ligand). Electronic communication between the axial ligands, B and NO<sub>2</sub>, occurs largely through the metal  $d_z^2$  and  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$  orbitals. In this context, we propose that  $\Delta\nu$  is reflective of the net charge transfer to or from the nitro group with the smaller  $\Delta\nu$  representing more charge transfer. Actually in nitrite anion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> representing the case with complete electron transfer the  $\nu_a(\text{NO}_2)$  and  $\nu_s(\text{NO}_2)$  are close to each other with  $\nu_a(\text{NO}_2)$  even lower than  $\nu_s(\text{NO}_2)$  [54]. In all series, the order 1-MeIm < NH<sub>3</sub> < Py holds true for  $\Delta\nu$ . This does not correlate with the Broensted base strengths of these ligands, where 1-MeIm is intermediate between Py and NH<sub>3</sub> (the pK<sub>a</sub>'s of the conjugate acids for Py, 1-MeIm and NH<sub>3</sub> are equal to 5.25, 6.95 and 9.25 correspondingly [55]), however, the observed order may be rationalized by taking into account the modest  $\pi$ -donor character of 1-MeIm, while NH<sub>3</sub> is a  $\sigma$ -donor only and Py is a  $\pi$ -acceptor [56]. In the Co(III) series, the empty coordination site clearly leads to a much larger value of  $\Delta\nu$  as would be expected from the premise that this reflects the relative electron donor strength (in this case, none) of the *trans* ligand. If so, however, the position of NO in the Fe(III) series (largest  $\Delta\nu$ ) is especially interesting, since it suggests that there is very little net electron transfer from NO to the nitro ligand in the complex Fe(Por)(NO)(NO<sub>2</sub>). Such a conclusion draws some confirmation in DFT calculations (both B3LYP/3-21g and B3LYP/6-31g) for Fe(P)(NO)(NO<sub>2</sub>) (P = porphinato dianion) that found the coordinated NO to have a slightly negative charge, hence having a net electron withdrawing effect. The data of Table 4 reveal less charge transfer for Co-porphyrins in comparison with Fe-porphyrins.

Table 4

**FTIR frequencies of the coordinated nitro group in the 6-coordinate complexes of metalloporphyrins (data for  $^{15}\text{NO}_2$  isotopomer are given in parenthesis)**

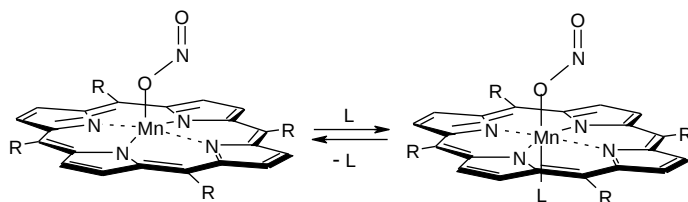
| Compound                                    | $\nu_a(\text{NO}_2)$ ,<br>$\text{cm}^{-1}$ | $\nu_s(\text{NO}_2)$ ,<br>$\text{cm}^{-1}$ | $\delta(\text{ONO})$ ,<br>$\text{cm}^{-1}$ | $\Delta\nu=\nu_a(\text{NO}_2)-\nu_s(\text{NO}_2)$ | Reference |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
| (NO)Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> )               | 1455(1423)                                 | 1295(1275)                                 | 805 (800)                                  | 160 (148)                                         | 43        |
| (NO)Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> )               | 1456(1424)                                 | 1295(1274)                                 | 803(797)                                   | 161 (150)                                         | 43        |
| (NH <sub>3</sub> )Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> ) | 1399<br>(1367)                             | 1310<br>(1291)                             | 810<br>(~804)                              | 89 (76)                                           | 44        |
| (NH <sub>3</sub> )Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> ) | 1399(1373)                                 | 1312(1291)                                 | 812(~805)                                  | 87 (82)                                           | 44        |
| (Py)Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> )               | 1405(1373)                                 | 1306(1287)                                 | 810(~804)                                  | 99 (86)                                           | 44        |
| (Py)Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> )               | 1406<br>(1379)                             | 1307<br>(1287)                             | 810<br>(~804)                              | 99 (92)                                           | 44        |
| (1-MeIm)Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> )           | 1396<br>(1363)                             | 1312<br>(1291)                             | 813<br>(~805)                              | 84 (72)                                           | 44        |
| (1-MeIm)Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> )           | 1395<br>(1371)                             | 1312<br>(1290)                             | 812<br>(~805)                              | 83 (81)                                           | 44        |
| (THF)Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> )              | 1409<br>(1384)                             | 1310<br>(1288)                             | 812 (802)                                  | 99(96)                                            | 45        |
| (THF)Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> )              | 1411<br>(1386)                             | 1307<br>(1286)                             | 811(803)                                   | 104(100)                                          | 45        |
| (DMS)Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> )              | 1399<br>(1373)                             | 1302<br>(1283)                             | 810 (802)                                  | 97(90)                                            | 48        |
| (DMS)Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> )              | 1401(1374)                                 | 1300(1281)                                 | 809(~805)                                  | 101(93)                                           | 48        |
| (THT)Fe(TPP)(NO <sub>2</sub> )              | 1407(1377)                                 | 1303(1284)                                 | 807(~802)                                  | 104(93)                                           | 48        |
| (THT)Fe(TTP)(NO <sub>2</sub> )              | 1405(1376)                                 | 1302(1283)                                 | 808(~802)                                  | 103(93)                                           | 48        |
| Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )                   | 1468<br>(~1440)                            | 1282<br>(1264)                             | ~805<br>(796)                              | 186(176)                                          | 49        |
| (NH <sub>3</sub> )Co(TPP)(NO <sub>2</sub> ) | 1431<br>(1400)                             | 1309<br>(1289)                             | 814 (805)                                  | 122(111)                                          | 51        |
| (Py)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )               | ~1439<br>(1404)                            | 1310<br>(1288)                             | 816 (806)                                  | 129(116)                                          | 51        |
| (Pip)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )              | ~1437<br>(1402)                            | 1308<br>(1285)                             | 808 (-)                                    | 129(117)                                          | 51        |
| (1-MeIm)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )           | 1420<br>(1394)                             | 1313<br>(1292)                             | 816 (809)                                  | 107(102)                                          | 52        |
| (DMS)Co(TTP)(NO <sub>2</sub> )              | 1444(1413)                                 | 1298(1279)                                 | 810(~802)                                  | 146(134)                                          | 26        |
| (THT)Co(TTP)(NO <sub>2</sub> )              | 1443(1413)                                 | 1300(1282)                                 | 810(~802)                                  | 143(131)                                          | 26        |
| (Acetone)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )          | 1459<br>(1429)                             | 1300<br>(1281)                             | 810 (802)                                  | 159(147)                                          | 53        |
| (2-butanone)(Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )      | 1458<br>(1428)                             | 1302<br>(1281)                             | 811 (803)                                  | 156(147)                                          | 53        |
| (Acetophenone)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )     | 1471<br>(~1441)                            | 1297<br>(1276)                             | 807 (802)                                  | 174(165)                                          | 53        |
| (Benzaldehyde)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )     | 1465<br>(1433)                             | 1303<br>(1282)                             | 811 (803)                                  | 162(151)                                          | 53        |
| (Epichlorohydrin)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )  | 1458<br>(1432)                             | 1301<br>(1281)                             | 806 (802)                                  | 157(151)                                          | 53        |
| (THF)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )              | 1462<br>(1430)                             | 1300<br>(1279)                             | 808 (800)                                  | 162(151)                                          | 53        |
| (Methanol)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )         | 1463<br>(1433)                             | 1301<br>(1282)                             | 809 (803)                                  | 162(151)                                          | 53        |
| (Ethanol)Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )          | 1463<br>(1431)                             | 1298<br>(1278)                             | 804 (798)                                  | 165(153)                                          | 53        |
| (iso-propanol) Co(TPP)(NO <sub>2</sub> )    | 1462<br>(1428)                             | 1301<br>(1281)                             | 804 (798)                                  | 161(147)                                          | 53        |

A higher value of  $\Delta\nu$  corresponds a larger ONO angle. Actually in  $\text{NO}_2$  molecule ONO angle is equal to  $134^\circ$ , while in nitrite anion it is  $115^\circ$ , and intermediate values were obtained for the structurally characterized nitro-complexes of the Co- and Fe-porphyrins. The  $\Delta\nu$  values are systematically higher for the Co(III) complexes  $\text{Co}(\text{TPP})(\text{B})(\text{NO}_2)$  than for the Fe(III) analogs suggesting less charge transfer in the former case. This is also consistent with the ONO angles which are in the  $120\text{--}124^\circ$  range [57] for the Co(III) complexes compared to the more acute angles ( $116\text{--}120^\circ$ ) seen for similar nitro complexes of Fe(III) porphyrins [58].

Similar to ferrous-porphyrins [42], the interaction of small  $\text{NO}_2$  increments with layered  $\text{Mn}(\text{TPP})$  leads to the formation of the 5-coordinate nitrito complex  $\text{Mn}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO})$  [59] that was previously chemically synthesized and structurally characterized by Suslick and Watson [60]. In analogy to the  $\text{Fe}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO})$  species, nitrito coordination is characteristic of the 5-coordinate  $\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO})$  complex [60]. Although crystal structure of the 6-coordinate manganese substituted met-myoglobin  $\text{Mn}(\text{III})\text{Mb}(\text{ONO})$  has been determined and also reveals the O-bound nitrito coordination [61], the 6-coordinate nitrite complexes of other Mn-porphyrin models have not been obtained and characterized. In this context, we used sublimed porous layers of  $\text{Mn}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO})$  as a synthetic precursor to the 6-coordinate complexes with various proximal ligands and used *in situ* spectroscopy to determine effect on the coordination mode of the nitrite ligand [59].

Low-temperature interaction of  $\text{Mn}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO})$  with vapors of various ligands L leads to the formation of 6-coordinate nitrito  $\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TPP})(\text{L})(\eta^1\text{-ONO})$  (L = O-, S- and N-donors) complexes (Scheme 6). Formation of the 6-coordinate nitrito complexes is accompanied

**Scheme 6**



R – phenyl; L – THF, DMS, Py

by the shifts of the  $\nu(\text{N}=\text{O})$  band to lower frequencies and of the  $\nu(\text{N}-\text{O})$  band to higher frequencies. The frequency difference between these bands  $\Delta\nu = \nu(\text{N}=\text{O}) - \nu(\text{N}-\text{O})$  is a function of L and is smaller for the stronger bases (see Table 5). In this Table data for not numerous examples of the 6-coordinate O-nitrito complexes of Fe-porphyrins are also included.

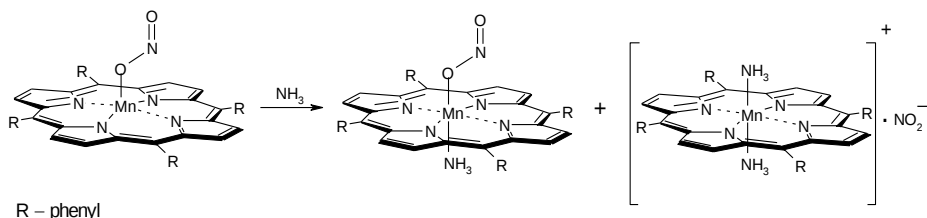
Table 5

Frequencies of stretching vibrations in  $\text{cm}^{-1}$  for coordinated O-nitrito group in the 6-coordinated complexes of Mn- and Fe-porphyrins with the various electron donor ligands. In parenthesis the data for  $^{15}\text{N}$ -labeled nitrito group are given.

| Complex                                  | $\nu(\text{N}=\text{O})$ , $\text{cm}^{-1}$ | $\nu(\text{N}-\text{O})$ , $\text{cm}^{-1}$ | $\Delta\nu = \nu(\text{N}=\text{O}) - \nu(\text{N}-\text{O})$ , $\text{cm}^{-1}$ | Q-bands, nm                 | Ref. |
|------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------|
| Mn(TPP)( $\eta^1$ -ONO)                  | 1445(1421)                                  | 1040(~1020)                                 | 405(401)                                                                         | 587, 625                    | 59   |
| Mn(TPP)(DMS)( $\eta^1$ -ONO)             | 1416(1394)                                  | ~1072(1052)                                 | 344(342)                                                                         | 581, 622                    | 59   |
| Mn(TPP)(THF)( $\eta^1$ -ONO)             | 1415(1391)                                  | 1084(1055)                                  | 331(336)                                                                         | 577, 616                    | 59   |
| Mn(TPP)(Py)( $\eta^1$ -ONO)              | 1398(1375)                                  | 1105(1084)                                  | 293(291)                                                                         | 576, 616                    | 59   |
| Mn(TPP)( $\text{NH}_3$ )( $\eta^1$ -ONO) | 1384(1357)                                  | 1115(1094)                                  | 269(263)                                                                         | —                           | 59   |
| Mn(TPP)(1-MeIm)( $\eta^1$ -ONO)          | 1382(1356)                                  | 1121(~1100)                                 | 261(256)                                                                         | 581, 619                    | 59   |
| Fe(TPP)( $\eta^1$ -ONO)                  | 1526(1499)                                  | 904(885)                                    | 622(614)                                                                         | 508, 577sh,<br>659, 689     | 42   |
| Fe(TPP)(THF)( $\eta^1$ -ONO)             | 1481(1448)                                  | 963(946)                                    | 518(502)                                                                         |                             | 45   |
| Fe(TPP)( $\text{NH}_3$ )( $\eta^1$ -ONO) | 1475(1445)                                  | 971(952)                                    | 504(493)                                                                         | 552, 595sh,<br>650sh, 695sh | 44   |
| Fe(TPP)(NO)( $\eta^1$ -ONO)              | 1496(1471)                                  | 938(920)                                    | 558(551)                                                                         | 548, 574                    | 43   |

The reaction of excess  $\text{NH}_3$  with  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO})$  leads to the formation of  $\text{Mn(TPP)}(\text{NH}_3)(\eta^1\text{-ONO})$  and cation  $[\text{Mn(TPP)}(\text{NH}_3)_2]^+$  plus ionic nitrite  $\text{NO}_2^-$  [59] (Scheme 7). When the layer is warmed up to higher temperature, the intensity of the  $\nu_a(\text{NO}_2^-)$  band begins to decrease with the concomitant increase in the intensity of the bands of 6-coordinate  $\text{Mn(TPP)}(\text{NH}_3)(\eta^1\text{-ONO})$  complex demonstrating reverse binding of  $\text{NO}_2^-$  after the release of one ammine ligand from the thermally unstable diammine complex. However not all of the diammine complex is converted back to the mixed 6-coordinate species, since under these experimental conditions, some of the latter decomposes to restore the parent O-nitrito complex  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO})$ . These data indicate that complex equilibrium exists between three species represented on the Scheme 7 depending on the pressure of  $\text{NH}_3$  and temperature.

Scheme 7



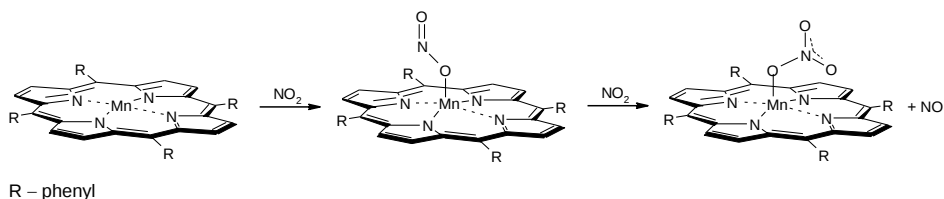
None of the 6-coordinate nitrito complexes of Mn-porphyrins were thermally stable at higher temperature, and each slowly decomposes by losing the L upon warming to RT. More stable are the adducts with less volatile Py and 1-MeIm ligands. Pumping overnight leads to complete decomposition of the Py complex

while about half of the 1-Melm complex still is present in the layer after this procedure.

Comparison of the results obtained for the 6-coordinate nitrite complexes of Fe- and Mn-porphyrins show that in the former the coordination of the electron donor ligands *trans* to nitrite leads to the nitrito  $\rightarrow$  nitro isomerization while in the latter the nitrito mode of the coordination remains unchanged.

**Nitrate complexes of metalloporphyrins.** Nitrate complexes of MPs are involved in key processes in nitrogen cycle and are transients formed as the result of heme mediated nitric oxide dioxygenation (NOD) [62]. For the mononuclear metallocomplexes two modes of coordination are known for nitrate ligand: the bidentate form through 2 oxygen atoms that is realized in the complex with Fe(TPP) and monodentate form realized for the iron-octaethylporphyrin complex Fe(OEP). While the 5-coordinate nitrate complexes are synthesized and characterized by X-ray analysis [23] the 6-coordinate nitrate complexes of MPs were not known and became possible to characterize only by the use of the sublimed layers methodology. It is worth noting that nitrate complexes of MPs cannot be sublimed without partial decomposition. The following reaction observed in our studies helps to have nitrate complexes of Fe- and Mn-porphyrins in sublimed layers. It was found that the nitrogen dioxide reaction with amorphous layers of Fe- and Mn-porphyrins eventually leads to the formation of the nitrate complexes [63, 64]. This reaction proceeds through the two distinct steps. The nitrito complexes are initially formed that transfers to the nitrate species upon supplying into the cryostat of new  $\text{NO}_2$  portions [43, 59]. These processes taking place for the Mn-derivative are demonstrated on the Scheme 8.

**Scheme 8**



In contrast, Co-porphyrins reveal different reactivity; after the formation of 5-coordinate nitro-complexes  $\text{Co(TPP)(NO}_2\text{)}$  at low  $\text{NO}_2$  pressures [65], introduction of the new  $\text{NO}_2$  increments results in oxidation of the porphyrin ring with the formation of a  $\pi$ -cation radical [66].

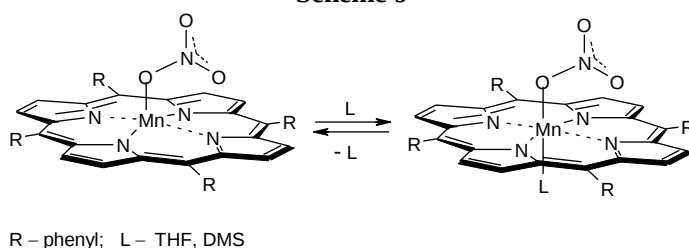
Supplying small portions of electron donor ligands into the cryostat containing thin layers of 5-coordinate Fe-porphyrin nitrate-complex it was possible to spectrally detect the formation of the 6-coordinate complexes. The coordination of the 6th ligand is accompanied with monodentate-bidentate isomerization of the coordinated nitrate ligand. Depending on the nature of the 6th ligand the corresponding species can be low or high spin. In case of strong nitric oxide ligand

the nitrate-nitrosyl complex  $(\text{NO})\text{Fe}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  is low-spin [67] whereas for the weak THF ligand remains high-spin as the parent nitrate complex [68].

It was found that the interaction of nitric oxide with the nitrate complexes of iron-porphyrins is not limited by the formation of nitrate-nitrosyl complex. In the presence of excess NO the nitrate-complex  $\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^2\text{-O}_2\text{NO})$  undergoes a series of transformations both in solid state and in non-coordinating solvent that results in the formation of iron-porphyrin complexes ligated by the various nitrogen oxides [33, 5]. The final products of solid state reactions are the nitrosyl complex  $\text{Fe}(\text{TPP})(\text{NO})$ , the nitro-nitrosyl complex  $\text{Fe}(\text{TPP})(\text{NO}_2)(\text{NO})$  and the nitrate complex  $\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^2\text{-O}_2\text{NO})$ , the relative quantities of which are the function of NO partial pressure. The formation of the nitro-nitrosyl complex  $(\text{NO})\text{Fe}(\text{Por})(\text{NO}_2)$  is accompanied with a concomitant formation of nitrogen dioxide  $\text{NO}_2$ . Hence the nitrate can be activated by heme-models to produce other highly reactive species that is strong oxidizing and nitrating agent. By using differently labeled by nitrogen nitrate complex and nitric oxide it was possible to suggest the mechanisms of these transformations [33].

6-coordinate nitrate complexes of Mn-porphyrins can also be obtained by the low temperature interaction of electron donor ligands with the layered  $\text{Mn}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  [59].

**Scheme 9**



Introduction of small increments of relatively weak O- and S-electronodonor ligands (THF and DMS) vapors into the cryostat containing thin layers of  $\text{Mn}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  at liquid nitrogen temperature followed by slow warming process leads to shifts of the IR bands of the coordinated nitrate group as it is shown in Figure 8 for the  $(\text{THF})\text{Mn}(\text{TPP})(\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{18}\text{O}_2)$  derivative.

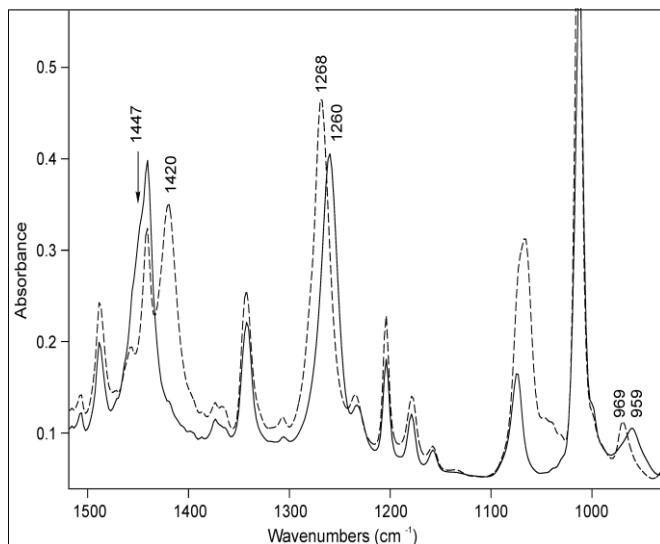


Fig. 8. FTIR spectra of  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{18}\text{O}_2)$  (solid line) and of  $\text{Mn(TPP)(THF)}(\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{18}\text{O}_2)$  (dashed line).

By analogy with other monodentate nitrato complexes [53] the two high-frequency stretching bands of the nitrato group can be assigned to the  $\nu_a(\text{NO}_2)$  and  $\nu_s(\text{NO}_2)$  vibrations of the uncoordinated  $\text{NO}_2$  fragment. The third band which belongs to the  $\nu(\text{O-N})$  stretching of the coordinated oxygen is usually disposed in the range of  $1000\text{ cm}^{-1}$  and in the spectra of natural abundance atoms in nitrato group is masked by the intense porphyrin band in this range. This band is apparent at  $959\text{ cm}^{-1}$  in the spectrum of species containing the  $^{18}\text{O}$  labeled nitrato group (Table 6, Fig. 8, solid line). From Figure 8 it is also clear that this band has low intensity and can readily be obscured by the intense porphyrin band in this range. As can be seen in Figure 8 upon coordination with a *trans* THF ligand the high-frequency  $\nu_a(\text{NO}_2)$  band noticeably shifts to a lower frequency, while the low frequency  $\nu_s(\text{NO}_2)$  band undergoes a minor higher frequency shift. . The low-intensity  $\nu(\text{O-N})$  band also undergoes a shift to higher frequency as can be seen in Fig. 8. The abovementioned bands show the appropriate isotopic shifts when the  $^{15}\text{N}$ - or  $^{18}\text{O}$ -labeled nitrato complexes were used, confirming that they belong to the coordinated nitrato group (Table 6). The data of Table 6 show that for the 6-coordinate nitrato complexes of Mn-porphyrins the values of  $\Delta\nu = \nu_a(\text{NO}_2) - \nu_s(\text{NO}_2)$  correlate well with the electron donor strengths of the sixth ligand being smaller for the stronger base ligands.

Table 6

**IR frequencies in  $\text{cm}^{-1}$  of differently labeled nitrate group in 6-coordinate complexes of metalloporphyrins with various *trans* electron donor ligands.**  
**In parenthesis the data for  $^{15}\text{N}$  labeled nitrate group are given.**

| Adduct                                                        | $\nu_a(\text{NO}_2)$ | $\nu_s(\text{NO}_2)$ | $\nu(\text{O-N})$ | Q bands, nm | Ref. |
|---------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------|------|
| Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                              | 1470                 | 1284                 | 998               | 580, 615    | 59   |
| Mn(TPP)(DMS)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                         | 1451(1407)           | 1289(1263)           |                   | 583, 618    | 59   |
| Mn(TPP)(THF)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                         | 1446(1410)           | 1290(1262)           |                   | 575, 610    | 59   |
| Mn(TPP)(THF)( $\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{18}\text{O}_2$ ) | 1419                 | 1269                 | 969               |             | 59   |
| Mn(TPP)(Py)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                          | 1427(1393)           | 1393(1269)           |                   | 578, 614    | 59   |
| Mn(TPP)(1-MeIm)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                      | 1418(1390)           | 1293(1264)           |                   |             | 59   |
| Mn(TPP)( $\text{NH}_3$ )( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )             | 1426(1403)           | 1290(1260)           |                   |             | 59   |
| Fe(TPP)(NO)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                          | 1505(1472)           | 1265(1246)           | 969(954)          | 547, 582    | 67   |
| Fe(TPP)(THF)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                         | 1491(1457)           | 1280(1258)           | ~997(986)         |             | 68   |
| Fe(TPP)( $\text{NH}_3$ )( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )             | 1499(1472)           | 1268(1249)           | 938(925)          |             | 68   |
| Fe(TPP)(1-MeIm)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                      | 1475(1434)           | 1278(1257)           |                   |             | 69   |
| Co(TPP)( $\text{NH}_3$ )( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )             | 1484(1459)           | 1270(1248)           | 983(970)          | 558, 597    | 70   |
| Co(TPP)(Py)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ )                          | 1477(1449)           | 1270(1247)           | 985(979)          | 549         | 71   |

The THF adduct Mn(TPP)(THF)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) can also be obtained at RT by the exposure of Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) to THF vapor (a few tens of torr). It is stable at RT when a few torr of THF are present in the cryostat, but it slowly loses the THF ligand in the course of pumping to restore the spectrum of the initial nitrate complex Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ). The THF complex readily decays when it is dissolved in non-coordinating solvent. Interaction of the S-donor ligand DMS with Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) leads to the same spectral changes as in the case of THF manifesting the formation of the 6-coordinate complex Mn(TPP)(DMS)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ). In this case, however, the complex is less stable and begins to decompose at temperatures higher than  $-30^\circ\text{C}$ .

The reactions of Mn(Por)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) with N-donor ligands  $\text{NH}_3$ , pyridine or 1-methylimidazole are more complex. With these ligands, nitrate complexes  $\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TPP})(\text{L})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  and cationic complexes  $[\text{Mn}(\text{TPP})(\text{L})_2]^+$  coexist in the layer, the latter formed as a result of  $\text{NO}_3^-$  displacement when L is in excess. The same pattern was observed earlier upon interaction of the iron-porphyrin nitrate complexes with strong ammonia ligand demonstrating lability of the coordinated nitrate [68]. Warming of the Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) +  $\text{NH}_3$  system to room temperature led to partial loss of  $[\text{Mn}(\text{TPP})(\text{NH}_3)_2]^+$  cation accompanied by the reformations of the 6-coordinate nitrate-complex Mn(TPP)( $\text{NH}_3$ )( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) and Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ). Thus, it appears that there is equilibrium between three different species represented in Scheme 10. The relative quantities of these complexes depend on the temperature and  $\text{NH}_3$  pressure. Our attempts to find conditions where only the 6-coordinate nitrate-complex was present in layered medium were unsuccessful. With the less volatile Py ligand, however, it was possible to convert all the species present in the layer to 6-coordinate (Py)Mn(TPP)( $\eta^1\text{-ONO}_2$ ) by vacuum pumping at RT (Fig. 9).

### Scheme 10

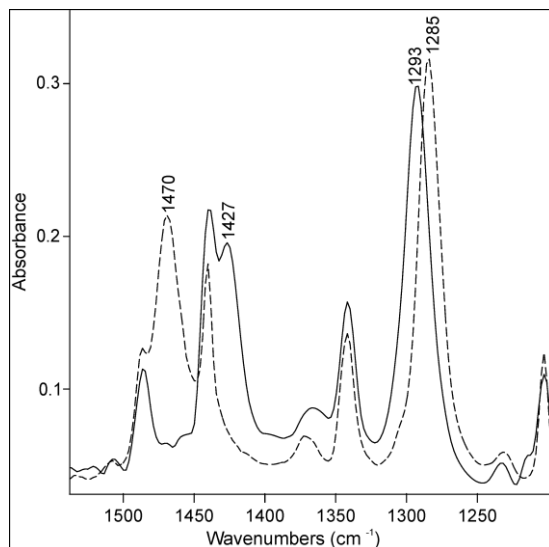
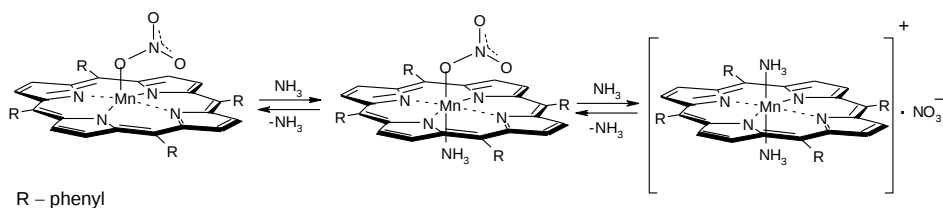


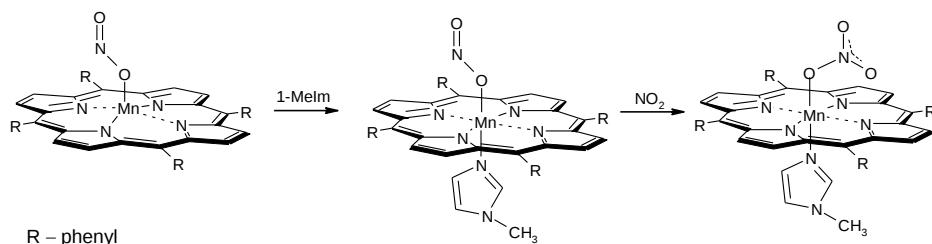
Fig. 9. FTIR spectra of layered  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO}_2)$  (dashed line) after exposure under vapors of Py (5 Torr) and short pumping (solid line) [59].

A ligand of special interest is 1-methyl-imidazole (1-MeIm), which is a mimic of histidine imidazole in hemeproteins. When layers of  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO}_2)$  in the cryostat were treated with saturated vapors of 1-MeIm, the IR bands of  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO}_2)$  disappeared with concomitant growth of bands characteristic to a 6-coordinate species. However, a significant quantity of  $[\text{Mn(TPP)}(1\text{-MeIm})_2]^+\text{NO}_3^-$  was also formed. The latter did not transform back to the 6-coordinate nitrate complex  $\text{Mn(TPP)}(1\text{-MeIm})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  upon high-vacuum pumping. Thus the binding of two axial 1-MeIm ligands in bis-ligated cationic complex is stronger than for Py. The  $[\text{Mn(TPP)}(1\text{-MeIm})_2]^+$  complex has really been isolated and structurally characterized [72].

The following strategy was implemented to obtain the 6-coordinate nitrate complex with an axial 1-MeIm ligand. The 5-coordinate nitrito-complex  $\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO})$  was first prepared as amorphous layers on the cryostat substrate. The reaction of this species with 1-MeIm vapors led to the formation of the 6-coordinate nitrito species  $(1\text{-MeIm})\text{Mn(TPP)}(\eta^1\text{-ONO})$  without displacement of the nitrite ion by excess of 1-MeIm. Since  $\text{Mn(TPP)}(1\text{-MeIm})(\eta^1\text{-ONO})$  was relatively stable to intense pumping, some of the 1-MeIm excess could thus be removed. Then the small portions of  $\text{NO}_2$  gas were introduced to react with  $\text{Mn(TPP)}(1\text{-MeIm})(\eta^1\text{-$

ONO) upon which intense bands at 1418 and 1293  $\text{cm}^{-1}$  (1390 and 1264  $\text{cm}^{-1}$  for  $^{15}\text{N}$  labeled isotopomer) (Table 5) appeared manifesting the formation of the  $\text{Mn}(\text{TPP})(1\text{-MeIm})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  complex according to Scheme 11 [59].

**Scheme 11**



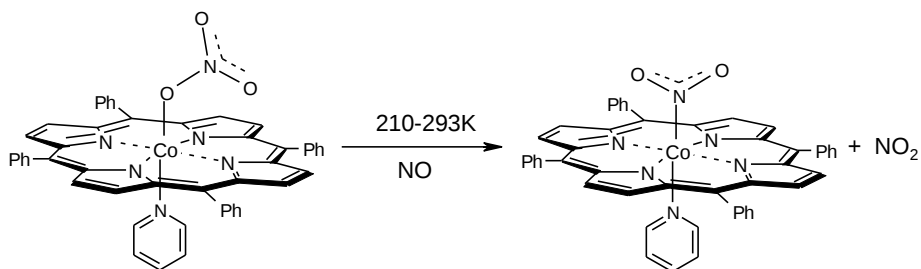
The same reaction sequence was earlier observed for iron-porphyrin nitrito complex  $\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO})$  [69]. The 6-coordinate nitrato complexes of Mn-porphyrins with *trans* Py and 1-MeIm ligands are stable in the solid state at RT, but dissolution in non-coordinating solvent leads to their decomposition.

Although nitrato complexes of Mn- and Fe-porphyrins reveal significant similarity in their reactions with electron donor ligands, they substantially differ in their reactivity regarding to nitric oxide NO. Neither formation of the nitrato-nitrosyl complexes nor further transformations of the nitrato ligand were observed in the course of low-temperature interaction of Mn-porphyrins nitrato complexes with NO.

It was mentioned above that the nitrato complexes of Co-porphyrins, in contrast to Fe- and Mn- analogs, cannot be obtained via interaction of gaseous  $\text{NO}_2$  with their sublimed layers [66]. However, it was recently shown, that they can be achieved as a result of nitric oxide dioxygenation (NOD) reaction, in which NO interact with specially constructed 6-coordinate dioxygen complexes of Co-porphyrins  $(\text{L})\text{Co}(\text{Por})(\text{O}_2)$  at low-temperatures [70, 71]. The 6-coordinate nitrato complexes of Co-porphyrins with *trans* ammonia and pyridine ligand have been obtained and spectrally characterized at low-temperatures through this reaction. The IR frequencies of nitrato group in these species are given in Table 6.

The fate of the 6-coordinate nitrato complexes  $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO}_2)$  upon warming to room temperatures depends on the experimental conditions. When nitric oxide was pumped out from the cryostat at 200 K and the layers were allowed to be warmed to RT the spectral changes clearly indicated that the 6-coordinate nitrato-complexes of Co-porphyrins decompose to nitrate-anion and amino-complexes of Co(III)-porphyrins. On the other hand if after the formation of the nitrato complexes some excess of the electron donor ligand was pumped out and a new higher portion of NO was added into the cryostat the spectral changes indicate the formation of 6-coordinate nitro complexes. These data indicate that the oxo-transfer reaction from the coordinated nitrato group to nitric oxide takes place as is represented on Scheme 12. Using differently labeled NO in the stages of nitrato complex formation and its reduction to nitro complex the mechanism of this transformation was determined.

Scheme 12



In summary the data presented in this review show that the sublimed layers methodology together with *in-situ* FTIR and electron absorption spectroscopy measurements and DFT computations give comprehensive information about the interactions of nitrogen oxides with heme models that otherwise could not be obtained.

Acknowledgements:

This work was supported by the SCS RA (Projects # 11-1D052 and 13-1D033).

## ՆԵՄ-ՄՈՂԵԼՆԵՐԻ ՆԵՏ ԱԶՈՏԻ ՕՔՍԻԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄՊԵԿՏՐԱԼ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

S. Ս. ԿՈՒՐՏԻԿՅԱՆ

Ազոտի օքսիդները ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  և այլն) կարևոր դերակատարումներ ունեն կաթնասունների օրգանիզմներում ընթացող ֆիզիոլոգիական պրոցեսներում՝ պայմանավորված հիմնականում հեմ-սպիրտակուցների հետ դրանց փոխազդեցություններով: Սինթետիկ մետաղապորֆիրինները մոդելավորում են հեմ-սպիրտակուցների ակտիվ կենտրոնը և ազոտի օքսիդների ներկայությամբ դրանց կոորդինացիոն ոլորտում ընթացող քիմիական պրոցեսների ուսումնասիրությունը հույժ կարևոր է հասկանալու համար բազմաթիվ ֆերմենտների գործելաձևը: Ակնարկում ներկայացված են հեղինակի փորձարաններում կատարված հետազոտությունները նվիրված ազոտի օքսիդների փոխազդեցություններին կենսաբանական կարևորություն ունեցող  $\text{Fe}^-$ ,  $\text{Co}^-$  և  $\text{Mn}$ -պորֆիրինների հետ: Օգտվելով էլեկտրոնային կլանման և Ֆուլլերի ձևափոխությամբ ինֆրակարմիր սպեկտրաչափական եղանակներից, հարուստ ինֆորմացիա է քաղվել այդ փոխազդեցությունների վերաբերյալ: Ազոտի օքսիդները ամբողջական լիգանդներ են հանդիսանում: Օգտագործելով տատանողական սպեկտրալ չափումներում իզոտոպային ազոտ և/կամ թթվածին պարունակող օքսիդներ և օգտվելով խտությունների ֆունկցիոնալի տեսության հաշվարկներից ստացված լրացուցիչ ինֆորմացիայից, հնարավոր է դարձել միանշանակորեն պարզել ազոտի օքսիդների կապման ձևերը և էլեկտրոնային կառուցվածքը նշված մետաղապորֆիրինների 5- և 6-կոորդինացված նիտրոգիլային, նիտրիտային և նիտրատային կոմպլեքսներում: Որոշվել է այդ պարամետրերի կախվածությունը մետաղի բնույթից: Հետազոտվել են ազոտի օքսիդների փոխակերպումները մետաղների կոորդինացիոն ոլորտում և բացահայտվել են դրանց մեխանիզմները: Ստացվել են նշված մետաղապորֆիրինների նախկինում անհայտ 6-կոորդինացված նիտրոգիլային, նիտրիտային և նիտրատային կոմպլեքսները տրանս- $\text{N}^-$ ,  $\text{S}^-$  և  $\text{O}$ -էլեկտրոնոդոնոր լիգանդների հետ և տատանողական սպեկտրերում կոորդինացված ազոտի օքսիդների կլանման շերտերի միանշանակ վերագրումներ են կատարվել:

# СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОКСИДОВ АЗОТА С ГЕМ-МОДЕЛЯМИ

Т. С. КУРТИКЯН

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии

НАН Республики Армения

Центр исследования строения молекулы

Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Факс (+37410) 282267 E-mail: kurto@netsys.am

Оксиды азота ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  и др.) играют важную роль в физиологических процессах, протекающих в организмах млекопитающих, что обусловлено, в первую очередь, их взаимодействием с гемопротейнами. Синтетические металлопорфирины моделируют активный центр гемопротейнов, и выявление химических процессов, имеющих место в их координационной сфере в присутствии оксидов азота, чрезвычайно важно для понимания механизмов функционирования многочисленных ферментов. В обзоре представлены работы, осуществленные в лабораториях автора и посвященные исследованиям взаимодействия оксидов азота с порфиринами биологически значимых Fe, Co и Mn. С помощью электронной абсорбционной и Фурье ИК-спектроскопии извлечена богатая информация относительно характера таких взаимодействий. Оксиды азота являются амбидентатными лигандами. Измерением колебательных спектров изотопозамещенных по азоту и/или кислороду оксидов и привлечением рассчитанных по теории функционала плотности данных однозначно определены способы координации и электронное строение 5- и 6-координационных нитрозильных, нитритных и нитратных комплексов исследованных металлопорфиринов. Выявлена зависимость этих параметров от природы металла. Исследованы превращения оксидов азота в координационной сфере металлов и выявлен их механизм. Получены ранее не известные 6-координационные нитрозильные, нитритные и нитратные комплексы отмеченных металлопорфиринов с *транс*-N-, S- и O-электронодонорными лигандами, и сделаны однозначные отнесения полос поглощения координированных оксидов азота в их колебательных спектрах.

## REFERENCES

- [1] Kurtikyan T.S., Gasparyan A.V., Martirosyan G.G., Zhamkochyan G.H. // J. App. Spectr., 1995, v. 62, p. 62 (Russ.).
- [2] Hayashi T. In Porphyrin Handbook. K. M. Kadish, K. M. Smith., R. Guillard Eds., World Publishing Company, Singapour, 2010, v. 5, Ch. 23, p. 2.
- [3] Lee H.C., Peisach J., Dou Y., Iceda-Saito M. // Biochemistry, 1994, v. 33, p. 7609.
- [4] Yonetani T., Drott H. R., Leigh J. S., Jr, Reed G. H., Waterman M. R., Asakura T. // J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 2998.
- [5] Kurtikyan T.S., Ford P.C. // Coord. Chem. Rev., 2008, v. 252, p. 1486.
- [6] Oshio H., Ama T., Watanabe T., Kincaid J., Nakamoto K. // Spectrochim. Acta, 1984, v. 40A, p. 863.

- [7] Ford P.C., Pereira J.C.M., Miranda K.M. in Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry, Biochemistry and Medicine II; Mingos D. M. P., Ed.; Structure and Bonding, Springer, Berlin, Germany. 2014, v. 154, p. 99.
- [8] Gerzer R., Hofmann F., Schultz G. // Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, p. 479.
- [9] Traylor T.G., Sharma V.S. // Biochemistry, 1992, v. 31, p. 2847.
- [10] Yoshimura T. // Inorg. Chim. Acta, 1984, p. 83.
- [11] Lin R., Farmer P. // J. Amer. Chem. Soc., 2001, v. 123, p. 1143.
- [12] Lorković I.M., Ford P.C. // J. Amer. Chem. Soc., 2000, v. 122, p. 6516.
- [13] Lorković I.M., Ford P.C. // Inorg. Chem., 2000, v. 39, p. 632.
- [14] Kurtikyan T.S., Martirosyan G.G., Lorković I.M., Ford P.C. // J. Amer. Chem. Soc., 2002, v. 124, 10124.
- [15] Martirosyan G.G., Azizyan A.S., Kurtikyan T.S., Ford P.C. // Chem. Commun., 2004, p. 1488.
- [16] Martirosyan G.G., Azizyan A.S., Kurtikyan T.S., Ford P.C. // Inorg. Chem., 2006, v. 45, p. 4079.
- [17] Azizyan A.S. // Chem. J. of Armenia, 2009, v. 62, p. 11 (Russ.).
- [18] Patterson J.C., Lorković I.M., Ford P.C. // Inorg. Chem., 2003, v. 42, p. 4902.
- [19] Renswurm M., Koesling D. // EMBO, 2004, v. 23 p. 4443.
- [20] Fernhoff N.B., Derbyshire E.R., Underbakke E.S., Marletta M.A. // J. Biol. Chem., 2012, v. 287, p. 43053.
- [21] Kurtikyan T.S., Hayrapetyan V.A., Martirosyan G.G., Ghazaryan R.K., Zhao H., Pierloot K., Iretskii A.V., Ford P.C. // Chem. Commun., 2012, v. 48, p. 12088.
- [22] Zahran Z.N., Chooback L., Copeland D.M., West A.H., Richter-Addo G.B. // J. Inorg. Biochem., 2008, v. 102, p. 216.
- [23] Wyllie G.R.A., Scheidt W. R. // Chem. Rev., 2002, v. 102, 1067.
- [24] Zahran Z.N., Lee J., Alguindigue S.S., Khan M.A., Richter-Addo G.B. // J. Chem. Soc., Dalton Trans., 2004, p. 44.
- [25] Kurtikyan T.S., Markaryan E.R., Mardyukov A.N., Goodwin J.A. // Inorg. Chem., 2007, v. 46, p. 1526.
- [26] Kurtikyan T.S., Gulyan G.M., Dalaloyan A.M., Kidd B.E., Goodwin J.A. // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 7793.
- [27] Martirosyan G.G., Kurtikyan T.S., Azizyan A.S., Iretskii A.V., Ford P.C. // J. Inorg. Biochem., 2013, v. 121, p. 129.
- [28] Kirsch M., Korth H.-G., Sustmann R., de Groot H. // Biol. Chem. 2002, v. 383, p. 389.
- [29] Espey M.G., Xavier S., Thomas D.D., Miranda K.M., Wink D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 2002, v. 99, p. 3481.
- [30] Pfeiffer S., Lass A., Schmidt K., Mayer B. // FASEB J., 2001, v. 15, p. 2355.
- [31] Bryan N.S., Rassaf T., Maloney R.E., Rodriguez C.M., Saijo F., Rodriguez J.R. Feelisch M. // Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 2004, v. 101, p. 4308.
- [32] Bourassa J.L., Ives E.P., Marqueling A.L., Shimanovich R., Groves J.T. // J. Am. Chem. Soc., 2001, v. 123, p. 5142.
- [33] Kurtikyan T. S., Gulyan G.M., Martirosyan G.G., Lim M.D., Ford P.C. // J. Am. Chem. Soc., 2005, v. 127, p. 6216.
- [34] Rassaf T., Feelisch M., Kelm M. // Free Rad. Biol. Med., 2004, v. 36, p. 413.
- [35] Gladwin M.T., Schechter A.N., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Hogg N., Shiva S., Cannon R.O., Kelm M., Wink D.A., Espey M.G., Oldfield E.H., Pluta R.M., Freeman B.A., Lancaster J.R., Feelisch M., Lundberg J.O. // Nat. Chem. Biol., 2005, v. 1, p. 308.
- [36] He Ch., Howes B.D., Smulevich J., Rumpel S., Reijerse E.J., Lubits W., Cox N., Knipp M. // J. Amer. Chem. Soc., 2015, v. 137, 4141.
- [37] Gladwin M.T., Grubina R., Doyle M.P. // Acc. Chem. Res., 2009, v. 42, p. 157.
- [38] Ford P.C. // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 6226.
- [39] Sparacino-Watkins C.E., Lai Y.C., Gladwin M.T. // Circulation, 2012, v. 125, p. 125.
- [40] Madigan M., Zuckerbraun B. // Front. Immun., 2013, v. 4, p. 174.
- [41] Xu N., Yi J., Richter-Addo G.B. // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 6253.

- [42] Kurtikyan T.S., Ford P.C. // *Angew. Chem. Intern. Edit.*, 2006, v. 45, p. 492.
- [43] Kurtikyan T.S., Hovhannisyan A.A., Hakobyan M.E., Patterson J.C., Iretskii A., Ford P.C. // *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, v. 129, p. 3576.
- [44] Kurtikyan T.S., Hovhannisyan A.A., Gulyan G.M., Ford P.C. // *Inorg. Chemistry*, 2007, v. 46, p. 7024.
- [45] Kurtikyan T.S., Hovhannisyan A.A., Iretskii A., Ford P.C. // *Aust. J. Chem.* 2009, v. 62, p. 1226.
- [46] Yi J., Safo M.K., Richter-Addo G.B. // *Biochemistry*, 2008, v. 49, p. 6253.
- [47] Yi J., Heinecke J., Tan H., Ford P.C., Richter-Addo G.B. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, v. 131, p. 18119.
- [48] Kurtikyan T.S., Hovhannisyan A.A., Iretskii A., Ford P.C. // *Inorg. Chem.*, 2009, v. 48, p. 11236.
- [49] Kurtikyan T.S., Stepanyan T.G., Gasparyan A.V. // *Russ. J. Coordin. Chem.*, 1997, v. 23, p. 563.
- [50] Kurtikyan T.S., Mardukov A.N., Goodwin J.A. // *Inorg. Chem.*, 2003, v. 42, p. 8489.
- [51] Stepanyan T.G., Akopyan M.E., Kurtikyan T.S. // *Russ. J. Coordin. Chem.*, 2000, v. 26, p. 425.
- [52] Hovhannisyan A.A. // *Chem. J. of Armenia*, 2007, v. 60, p. 913 (Russ.).
- [53] Kurtikyan T.S., Mardukov A.N., Goodwin J.A. // *Russ. J. Coord. Chem.*, 2008, v. 34, p. 606.
- [54] Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 3<sup>rd</sup> ed.; Wiley: New York, 1978; p. 244.
- [55] *Handbook of Chemistry and Physics*, 77<sup>th</sup> Edition, Ed. D. A. Lide, CRC Press, 1996, p. 8 - 45 to 55.
- [56] Elliot M.G., Shepherd R.E. // *Inorg. Chem.*, 1987, 26, 2067-2073.
- [57] Goodwin J.A., Kurtikyan T.S., Bin Zheng B., Parmley D., Howard J., Green Sh., Walsh R., Standard J., Mardukov A.N., Przybyla D. // *Inorg. Chem.*, 2005, v. 44, p. 2215.
- [58] Nasri H., Wang, Y., Huynh B.H., Walker F.A., Scheidt W.R. // *Inorg. Chem.*, 1991, v. 30, 1483.
- [59] Kurtikyan T.S., Hayrapetyan V.A., Mehrabyan M.M., Ford P.C. // *Inorg. Chem.*, 2014, v. 53, p. 11948.
- [60] Suslick K.S., Watson R.A. // *Inorg. Chem.*, 1991, v. 30, p. 912.
- [61] Heinecke J.L., Yi J., Pereira J.C.M., Richter-Addo G.B., Ford P.C. // *J. Inorg. Biochem.*, 2012, v. 107, p. 47.
- [62] Kurtikyan T.S., Ford P.C. // *Chem. Comm.*, 2010, 46, 8570.
- [63] Kurtikyan T.S., Stepanyan T.G., Akopyan M.E. // *Russ. J. Coordin. Chem.*, 1999, v. 25, p. 721.
- [64] Kurtikyan T.S., Stepanyan T.G., Martirosyan G.G., Kazaryan R.K., Madakyan V.N. // *Russ. J. Coordin. Chem.*, 2000, v. 26, p. 345.
- [65] Kurtikyan T.S., Stepanyan T.G., Gasparyan A.V. // *Russ. J. Coordin. Chem.*, 1997, v.23, p. 563.
- [66] Kurtikyan T.S., Stepanyan T.G. // *Russ. Chem. Bull.*, 1998, v. 47, p. 695.
- [67] Kurtikyan T.S., Martirosyan G.G., Hakobyan M E., Ford P.C. // *Chem. Comm.*, 2003, p. 1706.
- [68] Gulyan G.M., Kurtikyan T.S., Ford P.C. // *Inorg. Chem.*, 2008, v. 47, p. 787.
- [69] Hovhannisyan A. A., Mehrabyan M.M., Kurtikyan T. S. // *Russ. Chem. Bull.*, 2013, v. 62, p. 1630.
- [70] Kurtikyan T.S., Eksuzyan S.R., Hayrapetyan V.A., Martirosyan G G., Hovhannisyan G.S., Goodwin J.A. // *J. Amer. Chem. Soc.*, 2012, v. 134, p. 13861.
- [71] Kurtikyan T.S., Eksuzyan S.R., Goodwin J.A., Hovhannisyan G.S. // *Inorg. Chem.*, 2013, v. 52, p. 12046.
- [72] Steffen W.L., Chun H.K., Hoard J.L., Reed C.A. / Abstracts of Papers; 175th National Meeting of the American Chemical Society, Anaheim, CA; March 13, 1978, INOR 15.

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ЭТАНОЛЬНОГО РАСТВОРА ЛЕЦИТИНА В ПРИСУТСТВИИ  
ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА**

**Дж. Д. ГРИГОРЯН, С. А. АПОЯН, Ж. Н. ЧОБАНЯН и Л. Г. МЕЛИК-ОГАНДЖАНЫН**

Ереванский государственный университет  
Армения, 0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1  
E-mail: svapoyan@ysu.am

Поступило 10 VI 2015

Кондуктометрическим методом изучено влияние диметилсульфоксида (ДМСО) на закономерности мицеллообразования в этанольном растворе лецитина (Ле). Показано, что с увеличением концентрации ДМСО увеличивается электропроводность растворов ДМСО-этанол и лецитин-этанол-ДМСО. Соответственно уменьшается критическая концентрация мицеллообразования лецитина. Методом ИК-спектроскопии показано, что функциональные Р=О и С=О группы молекулы лецитина, а также S=O группа молекулы ДМСО в спирте образуют водородную связь. В системе лецитин-спирт-ДМСО наблюдается изменение межмолекулярных взаимодействий по сравнению с системой лецитин-спирт.

Рис. 1, табл. 2, библиографических ссылок 16.

Известно, что диалкилсульфоксиды способствуют синтезу клеток, повышают проницаемость мембраны. Малые количества сульфоксидов не представляют опасности для биологических систем [1,2]. Мицеллярные системы являются простейшими моделями биомембран, и изучение физико-химических свойств растворов разных ПАВ в присутствии сульфоксидов может способствовать пониманию сложных процессов, протекающих в биологических мембранах. С этой целью изучено влияние диалкилсульфоксидов на процесс мицеллообразования и объемные характеристики растворов ПАВ. Обнаружен рост критической концентрации мицеллообразования (ККМ) в присутствии ионных ПАВ [3,4].

В настоящей работе в качестве ПАВ использовали природный эмульгатор фосфатидилхолин (лецитин-Ле). Известно, что лецитин составляет основу всех клеточных мембран и является нетоксичным

цвиттерионным эмульгатором [5-8]. Лецитин не растворяется в воде, однако при диспергировании в водной фазе образует везикулы и липосомы, которые широко используют для моделирования биологических мембран. В органических растворах добавление воды способствует образованию той или иной формы агрегатов лецитина [9-10]. Изучение солюбилизации амфотерицин-В в дисперсии лецитин-вода и в микроэмульсии вода-масло, стабилизированной лецитином, показало, что солюбилизация лекарства в обеих системах увеличивается с увеличением концентрации лецитина, причем в эмульсии ~в 40 раз больше, чем в водной дисперсии [11].

В представленной работе изучен процесс мицеллообразования лецитина в присутствии ДМСО, что может играть определенную роль в изменении свойств среды и межмолекулярных взаимодействий, происходящих в этих системах.

### **Экспериментальная часть**

Использовали 10% этанольный раствор лецитина в запаянных ампулах производства Харьковского завода. Разбавление растворов проводилось 96% этанолом, ДМСО фирмы "Lachema N.P.(Brno)". Непосредственное измерение удельной электропроводности ( $k$ ) проводилось с помощью прибора "Jenwey 4330" при 22°C, относительная ошибка  $5 \cdot 10^{-9}$  сименс (S). Межмолекулярные взаимодействия в системе лецитин – спирт и лецитин – спирт – ДМСО изучены методом ИК-спектроскопии с помощью прибора "Specord-75 IR". Для этой цели из спиртового раствора лецитина удалили спирт под вакуумом и сняли ИК-спектры чистого лецитина. Растворы лецитин-спирт и лецитин-спирт-ДМСО для регистрации ИК-спектров были приготовлены абсолютным спиртом.

### **Обсуждение результатов**

На рисунке приведены кривые зависимости электропроводности этанольного раствора лецитина в отсутствие (кр. 1) и в присутствии ДМСО (кр. 2-4). Из рисунка видно, что с увеличением концентрации ДМСО электропроводность растворов ДМСО-этанол и Ле-ДМСО-этанол увеличивается, а критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), определенная точкой перегиба кривой, уменьшается.

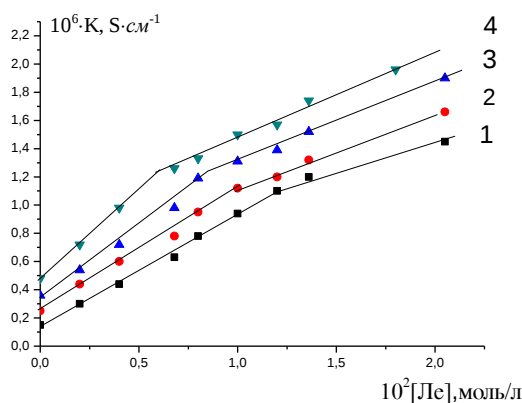


Рис. Зависимость электропроводности растворов от концентрации лецитина в присутствии ДМСО, моль/л: 1 – [ДМСО]=0; 2 – [ДМСО]=0.66; 3 – [ДМСО]=1.27; 4 – [ДМСО]=2.5.

В табл. 1 приведены значения ККМ в зависимости от концентрации ДМСО. На процесс мицеллообразования оказывают влияние как изменения свойств среды, так и различные межмолекулярные (гидрофильные и гидрофобные) взаимодействия, происходящие в этих системах. Исследование системы ДМСО-вода различными методами показало, что в водных растворах ДМСО водородная связь между молекулами ДМСО-вода сильнее, чем между одинаковыми молекулами ДМСО и воды, т.е. молекулы ДМСО в воде поляризованы [12,13]. Значение диэлектрической проницаемости ( $\epsilon$ ) 96% этанольного раствора находится в пределах 24-29 [14]. Следовательно, в этанольном растворе молекулы ДМСО поляризованы в меньшей степени, чем в воде ( $\epsilon_{\text{вода}} = 80$ ,  $\epsilon_{\text{ДМСО}} = 46.4$ ). Увеличение электропроводности растворов ДМСО-этанол и лецитин-этанол-ДМСО с увеличением концентрации ДМСО обусловлено увеличением полярности растворов (рис.).

Таблица 1

Значения ККМ этанольного раствора лецитина в присутствии ДМСО

| [ДМСО], моль/л | $10^2 [\text{ККМ}], \text{моль/л}$ |
|----------------|------------------------------------|
| 0              | 1.2                                |
| 0.66           | 1.06                               |
| 1.27           | 0.85                               |
| 2.5            | 0.6                                |

В присутствии лецитина увеличение полярности среды приводит к ухудшению взаимодействия между молекулами Ле-среды, вытеснению молекул лецитина из среды и облегчению процесса мицеллообразования. ККМ лецитина в толуоле равна  $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ моль/л}$  ( $\epsilon_{\text{толуол}} = 2.4$ ), т.е. мицеллообразование в неполярной среде происходит труднее[6]. Не ис-

ключается также возможность взаимодействия между молекулами Ле-ДМСО. Лецитин в своем составе имеет положительный центр заряда у атома азота и две функциональные группы  $P=O$  ( $P-O^-$ ) и  $C=O$ , которые играют роль акцептора протона в смешанных растворах с циклическими и алифатическими спиртами, причем благодаря высокой полярности  $P=O$  ( $P-O^-$ ) группа более чувствительна к влиянию межмолекулярных взаимодействий [15]. Методом ИК-спектроскопии установлено, что взаимодействие между молекулами лецитин-эргостерин в безводной среде  $CCl_4$  происходит с образованием водородной связи, в основном с участием кислородо-фосфатной, а не карбонильной группы [16]. Для выяснения взаимодействий, происходящих в системах лецитин-этанол и лецитин-этанол-ДМСО, использовали метод ИК-спектроскопии.

В табл. 2 приведены значения волновых чисел ( $\nu$ ) функциональных групп молекулы лецитина и ДМСО. Данные ИК-спектров показывают, что при растворении как ДМСО, так и чистого лецитина в спирте происходит уменьшение частоты валентного колебания  $S=O$  группы молекулы сульфоксида и частот валентных колебаний  $P=O$  и  $C=O$  групп молекулы лецитина. Это указывает на то, что уменьшается энергия связи этих групп, и т. к. спирты обладают слабокислотными свойствами, то, как и в работе [16], можно предположить, что и в нашем случае имеет место образование водородной связи молекулы спирта с кислородом функциональных групп лецитина и ДМСО. При добавлении ДМСО в спиртовой раствор лецитина наблюдается увеличение  $\nu_{P=O}$  и  $\nu_{C=O}$  групп молекулы лецитина. Можно полагать, что имеет место конкурентное взаимодействие ионизированных (возможно, также неионизированных) молекул ДМСО с функциональными группами и с положительно заряженным атомом азота лецитина. Это приводит к усилению интенсивности межмолекулярных взаимодействий этих групп в системе лецитин-спирт-ДМСО.

Таблица 2

**Значение волновых чисел ( $\nu$ ) функциональных групп лецитина и ДМСО**

| Функциональные группы | $\nu_{\max}, \text{см}^{-1}$ |                               |                                                                   |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                       | лецитин                      | лецитин-спирт                 | лецитин-спирт-ДМСО                                                |
| $C=O$                 | 1740                         | 1700-интенсивная узкая полоса | 1727                                                              |
|                       | 1730                         |                               | 1713                                                              |
| $P=O$                 | 1253                         | 1233                          | 1270-узкая полоса со слабой интенсивностью<br>1253-широкая полоса |
|                       | 1220                         | 1190                          |                                                                   |
|                       | ДМСО                         | ДМСО-спирт                    | лецитин-спирт-ДМСО                                                |
| $S=O$                 | 1063                         | 1053                          | 1030                                                              |

Уменьшение  $v_{s=0}$  в системах ДМСО-спирт и ДМСО-лецитин-спирт обусловлено вышеприведенными взаимодействиями, вследствие которых уменьшается плотность заряда молекул лецитина, они становятся более гидрофобными. Это приводит к ухудшению взаимодействия лецитин-среда, т.к. полярность растворов лецитин-этанол-ДМСО больше полярности растворов лецитин-этанол, вследствие чего облегчается мицеллообразование.

Таким образом, мицеллообразование лецитина в этаноле в присутствии ДМСО обусловлено как изменением свойств среды, так и межмолекулярными взаимодействиями, происходящими в этих системах.

## ԼԵՅԻՏԻՆԻ ԷԹԱՆՈԼԱՅԻՆ ԼՈՒԾՈՒՅԹՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱԶԻՄԻԱԿԱՆ ՎԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԻՄԵԹԻԼՍՈՒԼՖՕՔՍԻԴԻ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

**Ջ. Դ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Ս. Վ. ԱՓՈՅԱՆ,  
Ժ. Ն. ՉՈԲԱՆՅԱՆ և Լ. Գ. ՄԵԼԻԿ-ՕԳԱՆՋԱՆՅԱՆ**

*Կոնդուկտոմետրիկ եղանակով ուսումնասիրվել է դիմեթիլսուլֆօքսիդի ազդեցությունը էթանոլում լեցիտինի միջկապոյացման օրինաչափությունների վրա: Ցույց է տրվել, որ դիմեթիլսուլֆօքսիդի կոնցենտրացիայի մեծացումը բերում է էթանոլ-դիմեթիլսուլֆօքսիդ և լեցիտին-էթանոլ-դիմեթիլսուլֆօքսիդ համակարգի էլեկտրահաղորդականության մեծացման և համապատասխանաբար փոքրանում է լեցիտինի միջկապոյացման կրիտիկական կոնցենտրացիան: Իկ սպեկտրոսկոպիայի եղանակով ցույց է տրվել, որ լեցիտին-սպիրտ և դիմեթիլսուլֆօքսիդ-սպիրտ համակարգերում առաջանում են ջրածնական կապեր լեցիտինի մոլեկուլի  $P=O$  և  $C=O$  խմբերի, ինչպես նաև դիմեթիլսուլֆօքսիդի  $S=O$  խմբի և սպիրտի մոլեկուլների միջև: Իսկ լեցիտին-սպիրտ-դիմեթիլսուլֆօքսիդ համակարգում տեղի է ունենում միջմոլեկուլային փոխազդեցությունների փոփոխություն համեմատած լեցիտին-սպիրտ համակարգի հետ:*

## STUDY OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE ETHANOL SOLUTION OF LECITHIN IN THE PRESENCE OF DIMETHYLSULFOXIDE

**J. D. GRIGORYAN, S. A. APOYAN,  
J. N. CHOBANYAN and L. G. MELIK-OGANJANYAN**

Yerevan State University  
1, A.Manoukian Str., Yerevan, 0025, Armenia  
E-mail: svapoyan@ysu.am

The subject of the study is micelle formation in the ethanolic solution of lecithin in the absence and presence of dimethylsulfoxide (DMSO). It is shown that in the presence of DMSO the critical concentration of micellization decreases and the conductivity of solutions ethanol-DMSO and Le-ethanol-DMSO increases. The results are explained by increased polarity of DMSO-ethanol system and the micelle formation is facilitated. By IR spectroscopy it is shown that the  $P=O$  and  $C=O$  groups of lecithin, and  $S=O$  group of DMSO in alcohol form a hydrogen bond with an alcohol molecule. In the system lecithin-alcohol-DMSO the change of intermolecular interactions is observed compared

with the system Le-alcohol. These interactions may affect of the processes of micelle formation.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Sanmartin-Suarez C., Soto-Otero R., Sanchez-Sellero I., Mendez-Alvarez E.* // J. of Pharmacological and Toxicological Methods, 2011, v. 63, №2, p. 209.
- [2] *Маиковский М.Д.* Лекарственные средства. М., Новая волна, 14-е издание, 2004, т. 1, с. 175.
- [3] *Арутюнян Л. Р., Маркарян Ш.А.* // Коллоидный журнал, 2007, т. 69, №4, с. 447.
- [4] *Harutyunyan L.R., Markarian S.A.* // J.of molecular Liquids, 2011, v. 160, p. 136.
- [5] *Ленинджер А.* Основы биохимии. М., Мир, 1985, т. 1, с. 325.
- [6] *Арутюнян Р.С., Григорян Дж.Д., Симонян Г.С., Апоян С.А., Григорян В.В., Григорян М.В., Бейлерян Н.М.* // Физическая химия растворов , 2002, т. 76, №5, с. 846.
- [7] *Дякина Т.А., Деркач С.Р., Левачев С.М.* // Вестник МГУ, 2004, т. 45, №1, с. 58.
- [8] *Чудинова В.В., Захарова Е.У., Алексеев С.М.* // Биоорганическая химия, 1993, т. 19, №2, с. 243.
- [9] *Sjolund M, Lindblom C., Rilfors L. Arvidson C.* // J.Biophysical Society, 1987, v. 52, p. 145.
- [10] *Mloaddel T., Friberg S.E., Brin A.* // Colloid Polym Sci., 1996, v. 274, p. 153.
- [11] *Salerno K., Perez S., Monteagudo E., Carlucci A.* // J.Pharm.Sci., 2013, v. 26, №1, p. 189.
- [12] *Catalan J., Diaz C., Carcia-Blanco F.* // J. Org.Chem., 2001, v.66, p.5846.
- [13] *Markarian S.A., Zatikyan A.L., Bonora S., Fagnano C.* // J. Mol. Struct., 2003, v. 665, p.285.
- [14] *Petong P., Pottel R., Kaatze I.* // J.Phys.Chem., 2000, v. 104, p. 7420.
- [15] *Коваль В.Г.* // Журнал прикладной спектроскопии, 1977, т. 27, №4, с. 756.
- [16] *Коваль В.Г.* // Украинский биохимический журнал, 1978, т. 50, №1, с. 64.

## ЭКСТРАКТЫ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАК АНТИОКСИДАНТЫ

Л. Р. ВАРДАНЯН

Горисский государственный университет  
Армения, 3205, Горис, ул. Авангарда, 4  
Факс: (374 284) 23603; E-mail: luisemari@rambler.ru

Поступило 25 V 2015

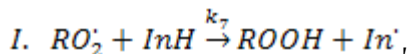
На примере модельной реакции инициированного окисления кумола кинетическим методом исследованы антиоксидантные свойства этилацетатных экстрактов листьев и плодов одиннадцати различных растений. Определены содержание антиоксидантных веществ в исследованных экстрактах и их антиоксидантная активность. Установлено, что из исследованных экстрактов наибольшее количество антиоксидантов содержится в экстрактах из листьев дуба черешчатого ( $0.96 \cdot 10^{-4}$  моль/л в одном мг-е) и горечавки перекрестнолистной ( $0.97 \cdot 10^{-4}$  моль/л). Наибольшую антиоксидантную активность проявляют экстракты из листьев горечавки перекрестнолистной ( $1.725 \cdot 10^5$  моль/лс), мерингии бокоцветковой ( $1.331 \cdot 10^5$  моль/лс) и головчатки альпийской ( $1.223 \cdot 10^5$  моль/лс). Показано, что антиоксидантную активность проявляют также продукты окисления (QH) исходных антиоксидантов, находящихся в экстрактах. Обнаружена линейная корреляционная зависимость между значениями предэкспонентов ( $\lg A$ ) и энергией активации ( $E$ ) для констант скоростей реакции  $RO_2^* + InH \xrightarrow{k_7} ROOH + In^*$  и  $RO_2 + QH \xrightarrow{k_{71}} Q^* + ROOH$ . Установлено, что для констант  $k_7$   $\lg A_7 = (4.9 \pm 0.25) + (0.64 \pm 0.032)E_7$ , а для  $k_{71}$   $\lg A_{71} = (2.6 \pm 0.13) + (0.64 \pm 0.032)E_{71}$ .

Рис. 5, табл. 1, библиограф. ссылок 15.

В последние десятилетия в связи с ухудшением экологической обстановки среды все больше внимания уделяется профилактике многих заболеваний, развитие которых в той или иной степени связано с вредным действием свободных радикалов. В этом плане особое место занимают природные антиоксиданты (АО) растительного происхождения, которые отличаются малой токсичностью, легко добываемы и обладают полифункциональной активностью [1-3]. Следовательно, поиск и исследование экстрактов растений, обладающих наибольшей антиради-

кальной и антиоксидантной активностью (АОА), является актуальной задачей.

Ежегодно в научной литературе публикуются многочисленные работы, посвященные АОА экстрактов растений [4-7]. В этих работах АОА приводятся в единицах  $mg\%$ ,  $mg/ml$  либо  $mg/g$ , что характеризует не АОА, а содержание АО в исследованных экстрактах. Из классической литературы [8] известно, что АОА представляет собой константу скорости реакции линейного обрыва цепи в радикальных реакциях на ингибиторах ( $InH$ ), в процессах же окисления — константу скорости реакции ( $k_7$ ):



которая зависит от природы  $InH$ , старения  $RO_2^{\cdot}$  радикалов и, естественно, не зависит от количественного содержания  $InH$ .

Антиоксидантное действие как индивидуальных ингибиторов, так и экстрактов растений характеризуется тремя параметрами.

1. Содержанием — естественно, чем больше содержание АО в исследуемом экстракте, тем больше время торможения данного свободно-радикального процесса.

2. Емкостью — показывает число радикалов, захватывающихся одной молекулой АО. Этот параметр для АО в экстрактах не определяется, поскольку экстракты, как правило, содержат по химическому составу два и более АО веществ, которые могут привести как к синергизму, так и к антагонизму.

3. Активностью — как было указано выше, активность антиоксиданта характеризуется константой скорости реакции  $I$ , если действие АО определяется участием в обрыве цепи свободнорадикальной реакции. Для экстрактов АОА, естественно, является эффективной величиной, поскольку в реакции  $I$  участвует не одно соединение ингибитора, а два и более.

В данной работе приведены результаты определения суммарного содержания АО в экстрактах из одиннадцати растений и их АОА.

## Экспериментальная часть

В качестве модельной реакции было выбрано ингибированное окисление кумола. Опыты по окислению проводили на манометрической установке с автоматическим регулированием давления. Используемые реактивы — кумол, хлорбензол, АИБН и этилацетат, очищали по методике, описанной в [9]. Экстракты использованных растений получали следующим образом: после сбора сырья их высушивали в сушильном шкафу при  $40^{\circ}C$ , сухое сырье измельчали в керамической ступке до порошкообразного состояния ( $<1\text{ мм}$ ), на полученный порошок при ком-

натной температуре добавляли перегнанный этилацетат (на 1 г порошка 20 мл), давали отстояться сутки, далее отфильтровывали бумажным фильтром. Фильтрат испаряли до постоянного веса при комнатной температуре ( $\sim 22 \pm 4^\circ\text{C}$ ).

Источником свободных радикалов являлся азо-диизобутиронитрил (АИБН), растворителем служил хлорбензол. Метод основан на непосредственной регистрации поглощенного кислорода в результате окисления кумола и позволяет по обнаруженным периодам индукций ( $\tau$ ) реакции определить суммарное содержание АО в исследованных экстрактах.

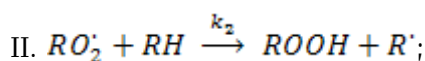
$$\tau = \frac{f \cdot [\text{InH}]_0}{V_i}, \quad (1)$$

где  $V_i$  — скорость инициирования;  $f$  — емкость АО — стехиометрический коэффициент ингибирования;  $[\text{InH}]_0$  — суммарная концентрация АО в исследуемом экстракте. Поскольку параметры  $f$  нами не измерялись, за суммарное содержание АО принимали произведение  $f \cdot [\text{InH}]_0$ .

АОА исследованных экстрактов определяли, спрямляя экспериментальные данные в координатах уравнения 2 [10]:

$$\Delta[\text{O}_2] = -\frac{k_2}{k_7} [\text{RH}] \ln \left( 1 - \frac{t}{\tau} \right), \quad (2)$$

где  $\Delta[\text{O}_2]$  — количество поглощенного кислорода за время  $t < \tau$ ;  $k_2$  — константа скорости реакции продолжения цепи



$[\text{RH}]$  — концентрация окисляющегося углеводорода — кумола. Во всех опытах концентрация кумола составляла 2.87 моль/л.

## Результаты и их обсуждение

Опыты показали, что при окислении кумола в присутствии всех использованных экстрактов кинетические кривые поглощения кислорода проходят с четко выраженными периодами индукций, что свидетельствует о наличии в экстрактах АО веществ. На рис. 1 представлены типичные кинетические кривые окисления кумола в отсутствие (пр. 1) и в присутствии экстрактов кожуры яблока малайского (кр. 2), листьев мерингии бокоцветковой (3) и листьев дуба черешчатого (4). Суммарное содержание АО ( $f[\text{InH}]_0$ ) определяли, спрямляя экспериментальные данные (рис. 2) в координатах уравнения 1.

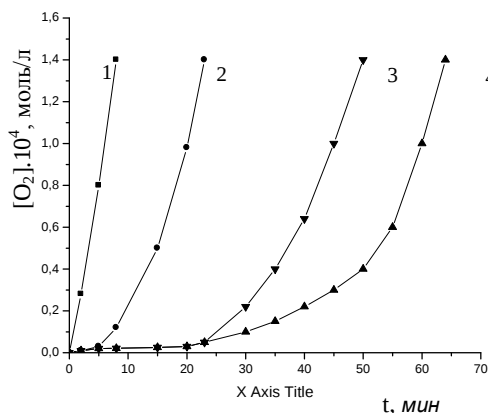


Рис. 1. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении кумола в отсутствие (1) и в присутствии 4 мг кожуры яблока малайского (2), листьев мерингии бокоцветковой (3), листьев дуба черешчатого (4).  $V_i = 1.25 \cdot 10^{-7}$  моль/л · с,  $T=348K$

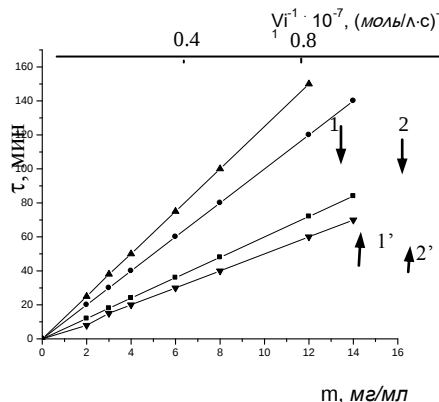


Рис. 2. Зависимость периодов индукции поглощения кислорода при окислении кумола: а) от содержания экстрактов ( $V_i = 1.25 \cdot 10^{-7}$  моль/л · с) из листьев дуба черешчатого (1) и астры степной (2); б) от обратной величины скорости иницирования (1'; 2';  $m_{экстр}=3.9$  мг).  $T=348K$ .

Из результатов, приведенных в таблице, следует, что из исследованных экстрактов в наибольшем количестве АО веществ содержится в экстракте из горечавки перекрестнолистной ( $0.97 \cdot 10^{-4}$  моль/л) и дуба черешчатого ( $0.96 \cdot 10^{-4}$  моль/л).

С целью определения АОА экспериментально измеренные концентрации поглощенного кислорода за время  $t < \tau$  спрямляли в координатах уравнения 2. Например, как видно из рис. 3, наблюдается четкая линейная корреляция между количеством поглощенного кислорода и параметром  $\ln(1-t/\tau)$ . Тангенсы углов полученных прямых соответствуют отношению  $k_2/k_7$ , и, учитывая, что для кумола  $k_2 = 4.677 \cdot 10^6 \exp(-9800/RT)$  л/моль · с [11], для исследованных экстрактов были определены численные значения  $k_7$ , характеризующие их АОА. Результаты этих расчетов представлены в таблице, из которой видно, что при окислении кумола из исследованных экстрактов наибольшую АОА проявляют экстракты листьев горечавки перекрестнолистной ( $1.725 \cdot 10^5$  моль/л · с), мерингии бокоцветковой ( $1.331 \cdot 10^5$  моль/л · с) и головчатки альпийской ( $1.223 \cdot 10^5$  моль/л · с). Полученные данные свидетельствуют о том, что указанные экстракты по АОА не уступают синтетическим классическим антиоксидантам. Так, например, константа скорости реакции  $k_7$  с кумилпероксидными радикалами для  $\alpha$ -нафтола при 333К равна  $1.6 \cdot 10^5$ , для гидрохинона —  $1.2 \cdot 10^5$ , для ионола —  $2 \cdot 10^4$  л/моль · с и т.д. [12]

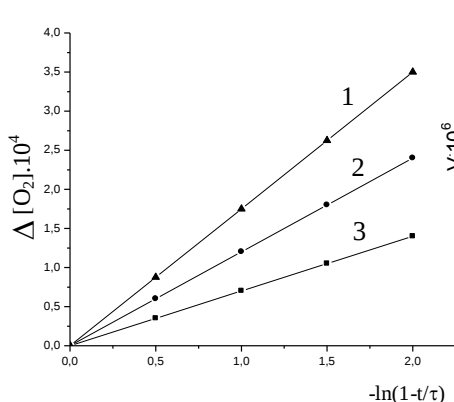


Рис. 3. Зависимость концентрации поглощенного кислорода от параметра  $-\ln(1-t/\tau)$  за время периода индукции при окислении кумола в присутствии экстрактов из листьев дуба черешчатого (1), горечавки перекрестнолистной (3) и травы астры степной (2).  $V_i = 1,25 \cdot 10^{-7}$  моль/л·с,  $T=348\text{K}$ .

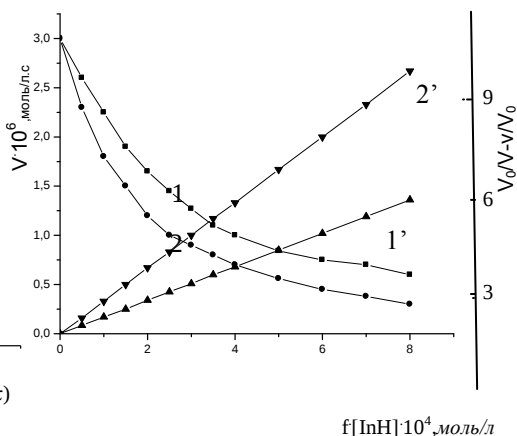
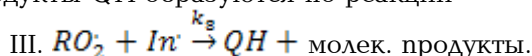


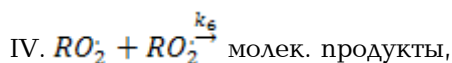
Рис. 4. Зависимость скорости окисления кумола после выхода из периода индукции от концентрации антиоксидантов, содержащихся в экстрактах из листьев мерингии бокоцветковой (1) и чистеца шершистого (2), и их спрямление (1',2') в координатах ур.3.  $V_i = 1,25 \cdot 10^{-7}$  моль/л·с,  $T=348\text{K}$ .

Сопоставляя приведенные в таблице результаты по содержанию АО веществ ( $f \cdot [InH_0]$ ) и по АОА ( $k_7$ ) исследованных экстрактов, как и следовало ожидать, не обнаружилась связь между этими параметрами. Этот факт еще раз подтверждает мысль, что АОА не зависит от концентрации ингибитора, т.е. от содержания АО в реакционной смеси. АОА, скорее всего, зависит от строения АО и  $RO_2$  радикалов, а также от среды реакционной смеси [13].

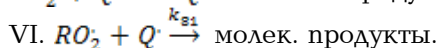
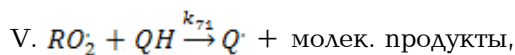
Опыты показали, что в присутствии исследованных экстрактов (за исключением экстрактов из листьев мароли) после выхода из индукционных периодов кинетические кривые поглощения кислорода по скоростям не стремятся к неингибированному окислению кумола (сравнить тангенсы углов прямых на рис.1). Аналогичные явления нами были обнаружены и в работах [13, 14]. Этот факт объясняется антиоксидантным свойством продуктов окисления (QH) исходных АО, находящихся в экстрактах. Продукты QH образуются по реакции



Причем продукты QH отличаются от исходных АО тем, что в их присутствии на кинетических кривых не обнаруживаются индукционные периоды, т.е. они, по сравнению с исходными АО, являются слабыми ингибиторами и в их присутствии обрыв цепи осуществляется как квадратично



так и линейно



В этих условиях скорость окисления кумола после выхода из индукционного периода описывается уравнением 3 [13].

$$V = k_2[RH] \frac{k_{71}[Q]}{k_6} \left[ \left( 1 + \frac{k_6 V_i}{k_{71}^2 [Q]^2} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (3)$$

Учитывая, что в отсутствие АО скорость окисления кумола ( $V_0$ ) равна

$$V_0 = \frac{k_2}{\sqrt{k_6}} [RH] \sqrt{V_i}, \quad (4)$$

то, преобразуя уравнение (3), получим

$$F = \frac{V_0}{V} - \frac{V}{V_0} = \frac{k_{71}[Q]}{\sqrt{k_6} V_i}, \quad (5)$$

где  $k_6$  и  $k_{71}$  — константы скорости реакции (IV) и (V);  $V_i$  — скорость иницирования. Здесь  $k_{71}$  характеризует АОА продуктов QH.

Как видно из рис. 4, экспериментальные данные спрямляются в координатах уравнения 5. Предполагая, что концентрация QH равна исходной концентрации АО в данном экстракте, т.е.  $[QH] = f[InH]_0$ , из тангенса углов прямых (1') и (2') вычислили значение  $k_{71}$  (в этих расчетах учитывалось, что для кумола  $k_6 = 4,74 \cdot 10^5 \exp(-1800/RT)$  [11]). Результаты приведены в таблице.

Из данных таблицы следует, что из продуктов окисления исследованных экстрактов наибольшую АОА после периода индукции реакции проявляют экстракты из листьев чистеца шершистого ( $k_{71} = 6.41 \cdot 10^2$  л/моль·с) и редьки полевой ( $k_{71} = 5.44 \cdot 10^2$  л/моль·с).

В интервале 328–348 К определены температурные зависимости для параметров  $k_7$  и  $k_{71}$  в аррениусовых координатах (табл.). Вычисленные значения энергии активации ( $E$ ) и предэкспоненты ( $A$ ) существенно превышают эти же значения для классических ингибиторов окисления в неполярных средах [12].

Аномально высокие значения  $E$  и  $A$  можно объяснить теорией электростатических моделей [15], согласно которой,

$$E = E_0 + (\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1), \quad (6)$$

$$A = (RT/Nh) \exp(\Delta S^\ddagger / R), \quad (7)$$

$$\Delta S^\ddagger = \Delta S_0^\ddagger + \sigma(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1), \quad (8)$$

где  $E$  — экспериментально измеренные величины энергии активации;  $\Delta S^\ddagger$  — энтропия активации;  $E_0$  и  $\Delta S_0^\ddagger$  — те же величины в случае протекания реакции в неполярной среде;  $\lambda$  и  $\sigma$  — параметры, характеризующие соответственно энергетическую и энтропийную составляющие

Таблица

**Суммарное содержание антиоксидантов в этилацетатных экстрактах  
некоторых растений и их антиоксидантная активность\***

| N  | Растение                                              | Сырье  | Время<br>сбора | $f[\text{InH}] \cdot 10^4$<br>моль/л | $k_7 \cdot 10^{-4}$ л/моль·с<br>348К | $\lg A_7$ | $E_7$ кал/<br>моль | $k_{71} \cdot 10^{-2}$<br>л/моль·с 348К | $\lg A_{71}$ | $E_{71}$<br>кал/моль |
|----|-------------------------------------------------------|--------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------|--------------------|-----------------------------------------|--------------|----------------------|
| 1  | чистец шершистый<br>stachys byzantina                 | листья | 10.07          | 0.33                                 | 8.61                                 | 8.52      | 5710               | 6.41                                    | 8.34         | 8760                 |
| 2  | айва обыкновенная<br>cydonia oblonga                  | листья | 25.07          | 0.83                                 | 14.78                                | 12.63     | 11870              | 1.96                                    | 6.13         | 6100                 |
| 3  | дуб черешчатый<br>quercus robur                       | листья | 10.08          | 0.96                                 | 6.21                                 | 14.10     | 14890              | 1.71                                    | 18.86        | 26480                |
| 4  | горечавка перекрестно-<br>листная gentiana cruciata L | листья | 10.07          | 0.97                                 | 17.25                                | 10.69     | 8690               | 2.18                                    | 7.34         | 7960                 |
| 5  | редька полевая<br>raphanus raphanistrum               | листья | 10.09          | 0.46                                 | 7.12                                 | 6.63      | 2830               | 5.44                                    | 8.08         | 8510                 |
|    |                                                       |        | 10.03          | 0.88                                 | 4.78                                 | 10.12     | 8665               | 3.07                                    | 7.63         | 8190                 |
| 6  | астра степная<br>Aster amellus                        | трава  | 21.07          | 0.76                                 | 8.47                                 | 11.27     | 10100              | 2.75                                    | 8.21         | 9190                 |
| 7  | головчатка альпийская<br>cephalaria alpina            | листья | 01.08          | 0.67                                 | 12.23                                | 11.48     | 10180              | 3.15                                    | 7.66         | 8220                 |
| 8  | мерингия бокоцветковая<br>moehringia lateriflora      | листья | 10.07          | 0.49                                 | 13.31                                | 7.14      | 3210               | 3.70                                    | 9.27         | 10670                |
| 9  | крассула наскальная<br>crassula rupestris             | трава  | 10.07          | 0.30                                 | 11.52                                | 8.49      | 5460               | 3.47                                    | 11.79        | 14730                |
| 10 | яблоко малайское<br>syzygium malaccense               | кожура | —              | 0.24                                 | 5.00                                 | 10.81     | 9730               | 2.27                                    | 4.66         | 3670                 |
| 11 | латук посевной<br>lactuca sativa                      | листья | 15.04          | 0.78                                 | 5.00                                 | 11.41     | 10460              | —                                       | —            | —                    |

\* – точность измерения экспериментальных данных  $\pm 5\%$ .

свободной энергии активации;  $\varepsilon$  — диэлектрическая проницаемость реакционной среды.

Преобразуя уравнения 6, 7 и 8, получим корреляции между предэкспонентом и энергией активации:

$$\lg A = \alpha E + \beta, \quad (9)$$

где  $\alpha = \sigma/2.3\lambda R$ ,  $\beta = \lg \left( \frac{RT}{Nh} \right) + \frac{\Delta S_0^\ddagger}{2.3R} - \frac{\sigma}{2.3R} E_0$  и при 348K,  $\beta = 12.86 + 0.22\Delta S_0^\ddagger - 0.22^\sigma E_0$

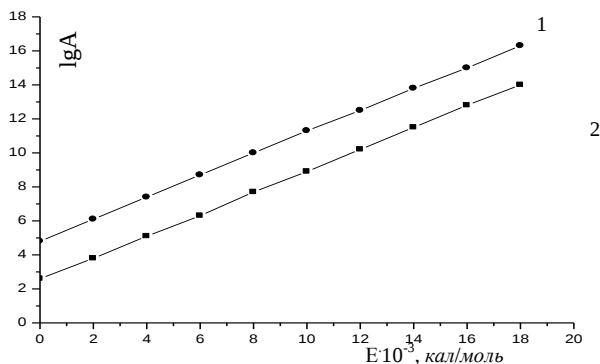


Рис. 5. Зависимость  $\lg A$  от энергии активации констант скорости реакции  $k_7$ (1) и  $k_{71}$  (2) для исследованных экстрактов.

Из рис. 5 видно, что для констант скорости реакции  $k_7$  и  $k_{71}$  экспериментально измеренные значения предэкспонентов и энергии активации спрямляются в координатах уравнения 9. Отсюда методом наименьших квадратов получено для константы  $k_7$

$$\lg A_7 = (4.9 \pm 0.25) + (0.64 \pm 0.03)E_7, \quad (10)$$

а для  $k_{71}$

$$\lg A_{71} = (2.6 \pm 0.13) + (0.64 \pm 0.032)E_{71}. \quad (11)$$

Таким образом, при известной скорости активации обнаруженные корреляционные уравнения 10 и 11 позволяют вычислить предэкспоненты и с помощью уравнения  $k = A \exp(-E/RT)$  определить численные значения констант скоростей реакций I и V при любой температуре.

## ՈՐՈՇ ԴԵՂԱԲՈՒՅՍԵՐԻ ԹՈՒՐՄԵՐԸ ՈՐՊԵՍ ՆԱԿԱՕՔՍԻԴԻՉՆԵՐ

### Լ. Ռ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ

Կուժուրի օքսիդացման մոդելային ուսուցիչային օրինակի վրա կիրառելի եղանակով հետազոտվել է տասնմեկ տարբեր բույսերի պտուղների ու տերևների էքստրակտների հակաօքսիդիչ ակտիվությունը: Հետազոտված էքստրակտներում որոշվել են ինչպես հակաօքսիդիչ նյութերի քանակությունը, այնպես էլ դրանց հակաօքսիդիչ ակտիվությունը: Հաստատվել է, որ հետազոտված էքստրակտներից առավելագույն քանակությամբ հակաօք-

սիդիզներ պարունակվում են կադնու ( $1 \text{ մգ-ում } 0.96 \cdot 10^{-4} \text{ մոլ/լ}$ ) և բոգու ( $0.97 \cdot 10^{-4} \text{ մոլ/լ}$ ) տերևների էքստրակտները: Ամենամեծ հակաօքսիդիչ ակտիվություն են դրսևորում բոգու ( $1.725 \cdot 10^5 \text{ մոլ/լ վրկ}$ ), մերինգիա կողբածաղկայինի ( $1.331 \cdot 10^5 \text{ մոլ/լ վրկ}$ ) և զիվան մարգագետնայինի ( $1.223 \cdot 10^5 \text{ մոլ/լ վրկ}$ ) տերևների էքստրակտները: Ցույց է տրված, որ հակաօքսիդիչ ակտիվություն են ցուցաբերում նաև էքստրակտներում առկա ելային հակաօքսիդիչների օքսիդացման արգասիքները (QH): Նկատվել է  $RO_2^{\cdot} + InH \xrightarrow{k_7} ROOH + In^{\cdot}$  ու  $RO_2^{\cdot} + QH \xrightarrow{k_{71}} Q^{\cdot} + ROOH$  ռեակցիաների համար ակտիվացման էներգիաների (E) ու նախաէքսպոնենտների ( $lgA$ ) միջև գծային կորելյացիոն կախվածություն: Հաստատվել է, որ  $k_7$  հաստատունի համար  $lgA_7 = (4.9 \pm 0.25) + (0.64 \pm 0.032)E_7$ , իսկ  $k_{71}$ -ի համար  $lgA_{71} = (2.6 \pm 0.13) + (0.64 \pm 0.032)E_{71}$ :

## EXTRACTS OF SOME HERBS AS ANTIOXIDANTS

L. R. VARDANYAN

Goris State University

4, Avantgarde Str., Goris, 3205, Armenia

Fax: (374 284) 23603, E-mail: luisemari@rambler.ru

On the example of the model reaction of cumene initiated oxidation the antioxidant properties of the ethyl acetate extracts of leaves and fruits of eleven different plants are investigated by kinetic method.

Both the content of the antioxidant substances in the studied extracts, and their antioxidant activity are defined. It is established that of the studied extracts the highest amount of antioxidants are contained in extracts of oak leaves ( $0.96 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$  in one  $mg-e$ ) and gentian ( $0.97 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ). The highest antioxidant activity extracts from the leaves of show gentian ( $1.725 \cdot 10^5 \text{ mol/l's}$ ), blunt leaven sandwort ( $1.331 \cdot 10^5 \text{ mol/l's}$ ), and Cephalaria ( $1.223 \cdot 10^5$ ). It is shown that oxidation products (QH) of original antioxidants in the extracts also possess antioxidant activities. The correlation between the pre-exponential factor ( $lgA$ ) и energy activation ( $E$ ) for the constant rate reaction

$RO_2^{\cdot} + InH \xrightarrow{k_7} ROOH + In^{\cdot}$  and  $RO_2^{\cdot} + QH \xrightarrow{k_{71}} Q^{\cdot} + ROOH$  was found. It is established that for constant  $k_7$   $lgA_7 = (4.9 \pm 0.25) + (0.64 \pm 0.032)E_7$ , and for  $k_{71}$   $lgA_{71} = (2.6 \pm 0.13) + (0.64 \pm 0.032)E_{71}$ .

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Дадали В.А. Процессы перекисного окисления в организме и природные антиоксиданты. Введение в частную микронутрионтологию. Новосибирск, 1999, с. 305.
- [2] Anes B.N., Sbigenaga M.K., Hagen T.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, v. 90, p.7915.
- [3] Halliwell B. // Free Rad. Res., 1996, v. 25, p. 57.
- [4] Yokozawa T., Cho E., Hara Y. // J. Agric. Food Chem., 2000, v. 48, p. 5068.
- [5] Шарафутдинова Г.Е., Иванова А.Н., Матерн А.И., Брайнина Х.З. // Аналитика и контроль, 2011, т. 15, №3, с. 281.
- [6] Жусупова Г.Е., Шалахметова Т.М., Мурзахметова М.К., Гадецкая А.В., Жусупова А.И. // Вестник Новосибирского гос. пед. унив-та, 2013, т. 5, №15, с. 43.

- [7] Гусева Д.А., Прозоровская Н.Н. // Биомедицинская химия, 2010, т. 56, вып. 3, с. 342.
- [8] Денисов Е.Т., Азатян В.В. Ингибирование цепных реакций. Черноголовка, 1997, 266 с.
- [9] Гордон А., Форд Р. Спутник химика, М., Мир, 1976, 541 с.
- [10] Харитонова Л.А., Козлова З.Г., Цепалов В.Ф., Гладышев Г.П. // Кинетика и катализ, 1979, №3, с. 593.
- [11] Денисов Е.Т. Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. М., Наука, 1971, 711 с.
- [12] Denisov E.T. Handbook of Antioxidants. CRS press. 1995, New York, 174 p.
- [13] Вардамян Р.Л., Вардамян Л.Р., Атабемян Л.В. // Химия растительного сырья, 2013, №1, с.151.
- [14] Вардамян Л.Р., Шутова А.Г., Айрапетян С.А., Вардамян Р. Л., Агабеков В.Е., Решетников В.Е.// ДНАН Белорусии, 2013, т. 57, №5, с. 72.
- [15] Энтелис С.Г., Тигер Р.П. Кинетика реакций в жидкой фазе. М., Химия, 1973, 416с.

## **АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**

UDC 543.06

### **A NOVEL, SIMPLE AND ACCURATE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-UV SPECTROMETRY METHOD FOR THE QUANTITATION OF COLCHICINE IN HUMAN PLASMA**

**L. R. GHOSHIKYAN**

E. Gabrielyan Scientific centre of drug and medical technology expertise  
49/4, Komitas Str., Yerevan, 0051, Armenia  
Fax: (+374-10)232118 E-mail: admin@pharm.am

The present work describes development and validation of a new, simple and accurate method of colchicine determination in human plasma by liquid chromatography with photodiode array detection. Isocratic reserved-phase separation was carried out on a C18 column (Nucleosil, Macherey-Nagel, 250×4.6 mm, 3μm) employing acetonitrile-water (40:60 v/v) with flow rate 1 ml/min as a mobile phase. Detection was performed at 300 nm. Colchicine and proposed new internal standard alprazolam were extracted from the matrix using pH=8.0 phosphate buffer and dichloromethane. Retention times were 5 min and 13 min for colchicine and alprazolam, respectively. Calibration curves were linear in concentration range 0.1-10 μg/ml. The lower limit of quantification for colchicine was found to be 0.1 μg/ml. Recovery was estimated to be reasonable with the result equal to 91.88%. Method revealed satisfactory results concerning selectivity, as absence of interference was observed with endogenous components of plasma. Precision (as relative standard deviation, RSD %) and accuracy (as relative error, RE %) were in range of 1.23-4.99% and 1.7-4.92%, respectively. Colchicine was found to be stable after three freeze-thaw cycles in the dark, as the final concentrations of colchicine in the stability samples were 94.7-98.9% of the initial value.

Developed method was successfully applied in colchicine assay in plasma of healthy volunteers, as well as in target cells such as mononuclear and polymorphonuclear leucocytes of the blood.

Familial Mediterranean fever is a genetically inherited disorder which is common among populations living around Southern and Eastern costs of

Mediterranean Sea: Armenians, Jews, Turks and Arabs. Amyloidosis is the main complication of disease. Eventually, it leads to chronic renal failure and renal transplant.

Since 1972, the drug of choice for prophylaxis of amyloidosis and FMF attacks is colchicine [1]. Despite the fact that colchicine is the only drug for treatment FMF, 15% of the patients do not respond to the colchicine therapy [2], and there is no other effective drug for FMF treatment yet. Taking into consideration actuality and seriousness of problem for population of Armenia, it is necessary to explore this phenomenon and find out the reason of colchicine resistance.

The aim of this study is to develop and validate a novel, simple and accurate method of identification and assay colchicine in human plasma and blood cells. There are several methods of colchicine quantification in human fluids, including Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [3], Liquid chromatography with ion spray ionization tandem mass spectrometry [4, 5], Liquid chromatography coupled with Diode array detector (DAD) [6] or UV [7] detector, Gas chromatography with mass spectrometric detection [8]. Each of mentioned methods has its drawbacks. Low reproducibility is the main drawback of GC method. MS methods are expensive and require highly qualified experts to work with the instrument. Therefore, it's advisable to use HPLC-UV or HPLC-DAD method to quantify colchicine in human plasma.

### Chemicals and Reagents

Colchicine (95% HPLC, Fig.1) was supplied by Sigma Aldrich, USA, Alprazolam (100%, European pharmacopoeia reference standard, Fig.2) used as internal standard was supplied by European Directorate for the Quality of Medicines. Organic solvents acetonitrile (AppliChem, Germany) and dichloromethane (Carl Roth, Germany) were HPLC grade. All solutions were prepared using highly purified water (Milli-Q water purification system, Millipore, France). Di-ammonium hydrogen phosphate (Carl Roth, Germany) was analytical grade. Donated blood and plasma stabilized with sodium citrate were kindly provided by medical centre "Arabkir", Armenia.

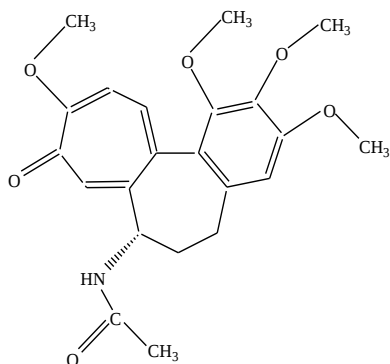


Fig. 1. Chemical structure of colchicine.

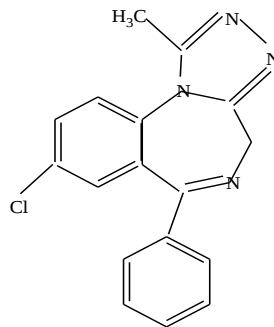


Fig. 2. Chemical structure of alprazolam.

### **Instruments and chromatographic conditions**

An HPLC PLATIN Blue system (Knauer, Germany) with PDA detector set at 300 nm was used for quantitative determination of colchicine and alprazolam in all samples. The analytical column employed was Nucleosil C18, 250×4.6, 3  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Germany), which was thermostated at 30°C. Elution was performed isocratically, with the flow rate 1 ml/min. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (40:60 v/v) was filtered through Porafil MV 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (Macherey-Nagel, Germany).

### **Preparation of standard solutions**

Stock standard solutions of colchicine (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) and internal standard alprazolam (100  $\mu\text{g/ml}$ ) were prepared by dissolving corresponding amounts of both compounds in mobile phase and stored at 4°C. Taking into consideration light sensibility of colchicine all working standard solutions were prepared before use in amber glass volumetric flasks at concentrations 1-100  $\mu\text{g/ml}$ . Working standard solution of the internal standard was prepared by dilution of stock standard solution of alprazolam to 10  $\mu\text{g/ml}$  using mobile phase as a solvent.

### **Preparation of sample solutions**

In order to prepare sample solutions for every validation criteria appropriate amounts of colchicine standard solutions and constant 100  $\mu\text{l}$  of standard solution of alprazolam (10  $\mu\text{g/ml}$ ) were added to 1 ml of plasma. After addition of 1.5 ml of phosphate buffer pH=8.0 obtained liquids were mixed 1 min. by vortex mixer. So as to extract colchicine and internal standard from the matrix 4.5 ml of dichloromethane was added, then mixtures were shaken vigorously in horizontal direction during 10 min.. After centrifugation for 10 min. at 3500 rpm, the clear organic layer was removed to 10 ml tubes and evaporated to dryness under the vacuum. Dry residue was reconstituted using 200  $\mu\text{l}$  of mobile phase, mixed by vortex mixer for 5 min., centrifuged at 3500 rpm for 5 min. and filtered by syringe nylon membrane filter 0.22  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel). 20  $\mu\text{l}$  of this filtrate was injected into the column.

### **Method validation**

Proposed method of colchicine assay in human plasma was validated by estimation of fundamental criteria of bioanalytical method validation such as selectivity, accuracy, precision, recovery, calibration curve and stability of analyte in spiked samples [9, 10]. Representative chromatograms of standard solutions of colchicine and alprazolam are shown in Fig 3. (A, B). Representative chromatogram of spiked sample solution is shown in Fig. 4.

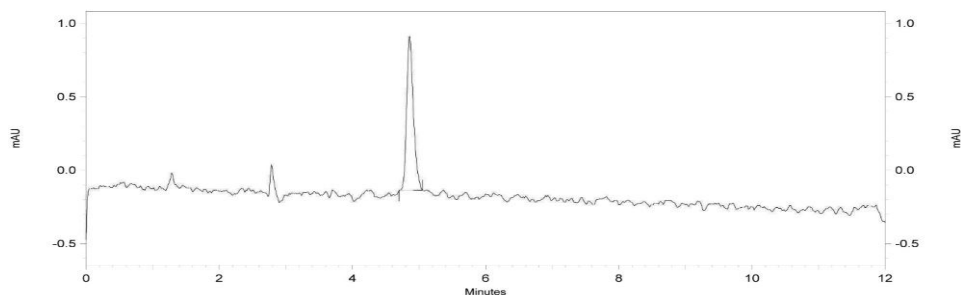


Fig 3A. Chromatogram of colchicine standard solution.

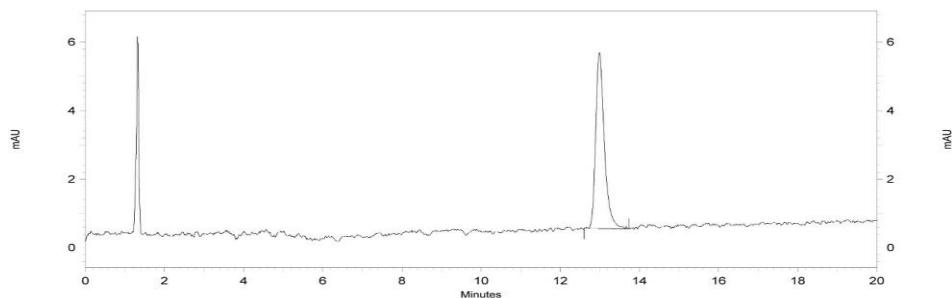


Fig. 3B. Chromatogram of alprazolam standard solution.

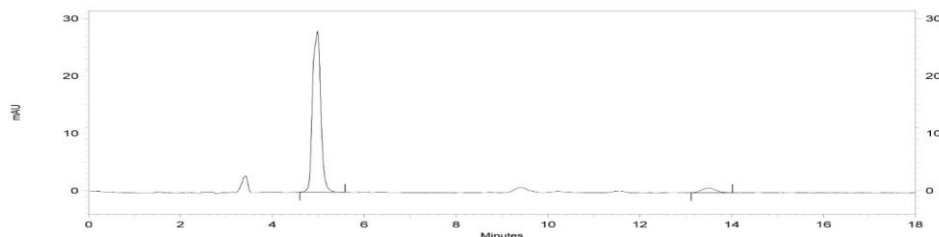


Fig. 4. Chromatogram of spiked sample solution.

Selectivity of the method was explored by comparison of the chromatograms obtained from plasma blank samples and plasma samples spiked with the colchicine. For reaching this goal 6 samples with the concentration of colchicine equal to  $0.1 \mu\text{g/ml}$  in 6 different plasmas and their blank samples were prepared.

Recovery or limit of extraction of colchicine from the plasma was assessed at low ( $0.2 \mu\text{g/ml}$ ), medium ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) and high ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) concentration of the analyte. In order to calculate extraction limit of colchicines ratio of pure standard solution of it were prepared with the same concentrations. Areas of sample and standard solutions were compared.

Samples for calibration curve were constructed using 6 concentration levels in the range  $0.1\text{-}10 \mu\text{g/ml}$  by plotting colchicine peak areas versus its concentrations. The lowest concentration level of calibration curve is lower limit of quantification (LLOQ) which is defined as the lowest concentration of analyte that can be

determined with acceptable precision of  $RSD = \pm 20\%$  and accuracy  $RE = \pm 20\%$ . 6 samples with concentration  $0.1 \mu g/ml$  were prepared to establish LLOQ value.

Accuracy and precision of were assessed at low  $0.2 \mu g/ml$ , medium  $1 \mu g/ml$  and high  $10 \mu g/ml$  concentration levels. For that purpose 5 series of each concentration were prepared.

Stability of analyte in biological matrix at intended storage temperatures is established by carrying out freeze-thaw cycles at low  $0.2 \mu g/ml$  and high  $10 \mu g/ml$  concentration levels. 5 series of plasma samples spiked with colchicine were frozen at  $-20^{\circ}C$ , then leave to thaw at room temperature. This cycle was repeated 2 more times. After the last cycle samples were assayed.

### Method application

Developed method was applied in colchicine assay in plasma of healthy volunteers, as well as in colchicine's target cells mononuclear and polymorphonuclear leucocytes of the blood. So as to carry out this experiment blood samples of male and female healthy volunteers were spiked with the colchicine to obtain concentration equal to  $10 \mu g/ml$ . Then samples were kept in thermostat for 15, 30, 45 minutes, then centrifuged to separate plasma and fractions of leucocytes. Obtained samples were treated as described in sample solution preparation and assayed afterwards.

### Results and discussion

#### Selectivity

Selectivity is the ability of a bioanalytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other components in the sample. In this study potential interfering substances are endogenous plasma components. On the chromatograms of the selectivity samples no any interference was found with other substances peaks. Colchicine and internal standard were properly resolved. This indicates high selectivity of the method and its correspondence to acceptance criteria of bioanalytical method selectivity parameter. Chromatograms of plasma blank sample and plasma spiked sample are shown in Fig. 5 (A, B).

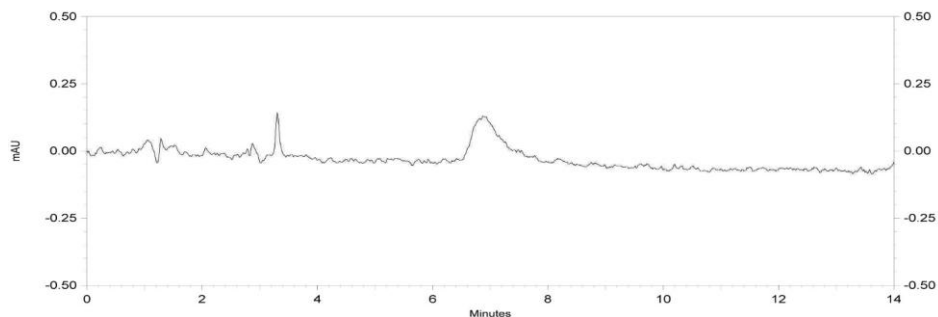


Fig. 5A. Chromatogram of plasma blank sample.

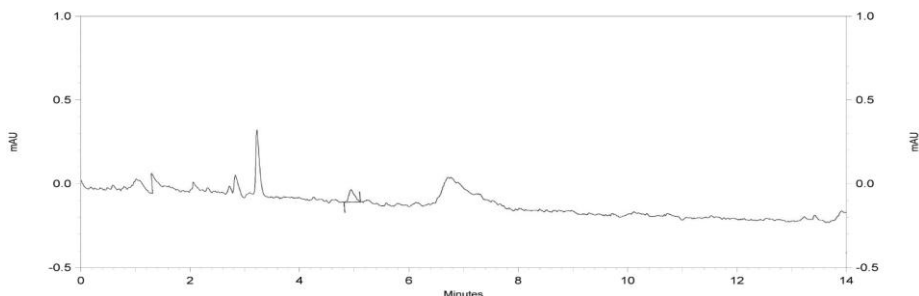


Fig. 5B. Chromatogram of spiked plasma sample.

### Recovery

Recovery of an analyte is its limit of extraction from the matrix. Recovery at low, medium and high concentrations was examined using five series of spiked samples with corresponding concentrations. Mean recoveries at three concentrations were 89.09 % (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ), 92.32 % (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and 94.24 % (10  $\mu\text{g/ml}$ ) samples. Average result of recovery at these three concentrations is 91.88%. So, extraction of colchicine from the matrix was estimate to be satisfactory.

### Linearity and lower limit of quantification

Calibration curve is the relationship between instrument response and known concentration of the analyte. It should be linear in the range of working concentrations. Calibration curve was linear over the range 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$  with a regression coefficient of 0.9998. Calibration curve is shown in Fig. 6.

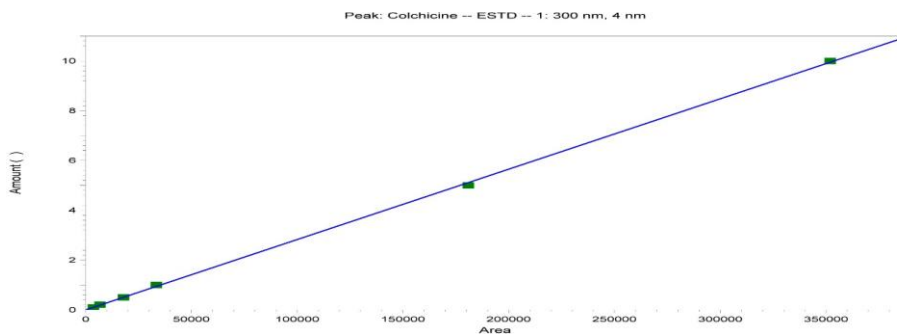


Fig.6. Calibration curve for Colchicine quantitation.

The lowest concentration level of the calibration curve is 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . It was established as the lower limit of quantification. Colchicine peak at this concentration was identifiable, discrete and reproducible. Concentrations of colchicine in 6 LLOQ plasma samples were determined with acceptable accuracy (RE=-5.67%) and precision (RSD=4.0 %). Results are shown in Table 1.

Table 1

**Lower limit of quantification**

| Sample             | Peak area          |                              | Determined concentration,<br>$\mu\text{g/ml}$ | RE, $\pm$<br>20% |
|--------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|------------------|
|                    | Blank of<br>plasma | LLOQ<br>$0.1 \mu\text{g/ml}$ |                                               |                  |
| LLOQ 1             | 0                  | 3451                         | 0.095                                         | -5               |
| LLOQ 2             | 0                  | 3601                         | 0.099                                         | -1               |
| LLOQ 3             | 0                  | 3561                         | 0.098                                         | -2               |
| LLOQ 4             | 0                  | 3340                         | 0.092                                         | -8               |
| LLOQ 5             | 0                  | 3232                         | 0.089                                         | -11              |
| LLOQ 6             | 0                  | 3391                         | 0.093                                         | -7               |
| Mean               | 0                  | 3429.333                     | 0.094333                                      | -5.67            |
| SD                 |                    | 138.3223                     | 0.003777                                      | –                |
| RSD,<br>$\pm 20\%$ |                    | 4.033505                     | 4.004019                                      | –                |

**Accuracy and precision**

Criterion of accuracy is defined as closeness of obtained concentration of the analyte using proposed method to the true value. Calibration curve was used to appraise concentration of colchicine in quality control samples of accuracy. Results of accuracy were evaluated by calculating RE for each concentration level.

Precision of the method describes degree of closeness of obtained results to each other for the same concentration level. It is assessed by determining RSD between obtained concentrations.

Proposed method revealed satisfactory results concerning criteria accuracy and precision. 5 series of samples at low ( $0.2 \mu\text{g/ml}$ ), medium ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) and high ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) concentration level were assayed for assessing this criteria. Result of accuracy and precision are shown in the Table 2. Method precision (as RSD %) and accuracy (as RE %) were in range 1.23-4.99% and 1.7-4.92%, respectively.

Table 2

**Accuracy and Precision**

| QC sample       | Recovery, $\mu\text{g/ml}$ |                    |                     |
|-----------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
|                 | $0.2 \mu\text{g/ml}$       | $1 \mu\text{g/ml}$ | $10 \mu\text{g/ml}$ |
| 1               | 0.204                      | 1.069              | 11.026              |
| 2               | 0.204                      | 1.003              | 9.996               |
| 3               | 0.207                      | 1.070              | 10.484              |
| 4               | 0.201                      | 1.087              | 11.008              |
| 5               | 0.201                      | 1.003              | 9.947               |
| N               | 5                          | 5                  | 5                   |
| Mean            | 0.2034                     | 1.0464             | 10.4922             |
| SD              | 0.00251                    | 0.040259           | 0.523096            |
| RSD, $\pm 15\%$ | 1.234012                   | 3.847397           | 4.985568            |
| RE, $\pm 15\%$  | 1.7                        | 4.64               | 4.92                |

## Stability

Stability research is performed to prove that storage conditions of the samples do not change concentration of the analyte in biological matrix. The aim of this study was to develop a method to quantify concentration of colchicine in human plasma. Usually, plasma samples are stored in deeply frozen condition. Therefore, it's rational to test stability by performing freeze/thaw cycles of spiked plasma samples. In order to reach this goal 5 series of spiked plasma samples with colchicine at low and high concentration levels were undergone 3 cycles of freeze/thaw as described above. The results of the stability study are presented in Table 3. Colchicine was found to be stable after three freeze-thaw cycles in the dark, as the final concentrations of colchicine in the stability samples were 94.7-98.9% of the initial value.

Table 3

Data of stability study

| Sample                    |   | Area of the peak          |                           |                          |                           |
|---------------------------|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                           |   | QC L 0.2 $\mu\text{g/ml}$ |                           | QC H 10 $\mu\text{g/ml}$ |                           |
|                           |   | QC sample (QC)            | Reference sample (QC-ref) | QC sample (QC)           | Reference sample (QC-ref) |
| Stability                 | 1 | 6349                      | 6775                      | 339565                   | 351821                    |
|                           | 2 | 6401                      | 6717                      | 345187                   | 350133                    |
|                           | 3 | 6373                      | 6693                      | 347213                   | 349905                    |
|                           | 4 | 6383                      | 6771                      | 346554                   | 351139                    |
|                           | 5 | 6359                      | 6695                      | 354201                   | 348995                    |
| N                         |   | 5                         | 5                         | 5                        | 5                         |
| Mean                      |   | 6373                      | 6730                      | 346544                   | 350399                    |
| SD                        |   | 20.347                    | 40.214                    | 5235.103                 | 1101.8                    |
| RSD, %                    |   | 0.319                     | 0.598                     | 1.51                     | 0.314                     |
| QC/QC <sub>ref</sub> 100% |   | 94.7                      |                           | 98.9                     |                           |

## Application of the method

Validated method was consecutively applied to assay colchicine in the plasma and leucocytes of healthy volunteers. Obtained plasma concentrations of colchicine were in the range 4,7-13,582  $\mu\text{g/ml}$ . Content of colchicine in mononuclear and polymorphonuclear leucocytes of the blood was in the ranges 1,52-120,4  $\text{ng}/10^6 \text{ cells}$  and 0,63-32,29  $\text{ng}/10^6 \text{ cells}$ , respectively. Obviously, concentration of colchicine in mononuclear leucocytes is higher than in polymorphonuclear leucocytes. Obtained results of this in vitro experiment coincide with literature data [9]. Literature data are obtained from experiments using blood of patients with FMF, who are taking tablets of colchicine. Plasma concentration of colchicine in that case is in nanogram level. Table 4 represents comparison of the data of in vitro and in vivo experiments [2], [9]. Motioned data show that concentration of colchicine in all studied fractions of the blood is higher 1000 times in in vitro experiment, but tendency of distribution of colchicine is the same. This result prove that in vitro experiment accurately

represents in vivo processes and it can be used to model distribution of colchicine in the blood in easily handled in vitro experiments.

Table 4

| Data of in vivo and in vitro experiments results                  |                    |                                        |                                        |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Obtained and literature data                                      | Plasma             | Polymorphonuclears                     | Mononuclears                           |
| Obtained date of application of the method<br>In vitro experiment | 4,7-13,58<br>μg/ml | 0,63-32,29<br>ng/10 <sup>6</sup> cells | 1,52-120,4<br>ng/10 <sup>6</sup> cells |
| Chappey O. and co-authors<br>In vivo experiment [2]               | 0,13-1,75<br>ng/ml | 4-64 ng/10 <sup>9</sup> cells          | 11,4-57,6<br>ng/10 <sup>9</sup> cells  |
| Lidar M. and co-authors<br>In vivo experiment [11]                | 0,33-1,71<br>ng/ml | 25,9-253,1 ng/10 <sup>9</sup><br>cells | 65-403<br>ng/10 <sup>9</sup> cells     |

### Conclusion

A novel and simple method of quantitative determination of colchicine in human plasma was developed, which used alprazolam as internal standard for the first time. The method was validated according to all requirements of method validation international guidelines. Validation revealed high degree of selectivity, linearity, accuracy, precision and stability and was successfully applied to in vitro assay of colchicine in plasma of healthy volunteers, as well as in target cells such as mononuclear and polymorphonuclear leucocytes of the blood. Data obtained from this method application proved that it can be used to model distribution of colchicine in the blood in easily handled in vitro experiments. Due to the usage of easily handled HPLC instrument and simple extraction procedure the method is rather practical and can be used in pharmacokinetic studies of colchicine, or in determination of colchicine in other biological specimens such urine, saliva and milk after making appropriate adjustments.

### Acknowledgments

This article could not be written to its fullest without Professor Tigran K. Davtyan PhD, DSc, Director of “Analytical laboratory” branch of Scientific Centre of Drug and Medical Technology Expertise CJSC who served as my supervisor and encouraged me throughout whole time spent doing this research.

Secondly, I thank Hakob V. Topchyan PhD, DSc, Director of Scientific Centre of Drug and Medical Technology Expertise CJSC for his huge support to this study.

### ԲԷՏԲ-ՈՒՄ ԵՂԱՆԱԿՈՎ ՄԱՐԴՈՒ ՊԼԱԶՄԱՅՈՒՄ ԿՈԼԽԻՑԻՆԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՆՈՐ, ՊԱՐԶ ԵՎ ՃՇԳՐԻՏ ՄԵԹՈՒԴ

Լ. Ռ. ՂՈԶԻԿՅԱՆ

Սույն աշխատանքում նկարագրված է լուսադիոդային դետեկտմամբ բարձր արդյունավետությամբ հեղուկային քրոմատոգրաման եղանակով մարդու արյան պլազմայում կոլիխինի քանակական որոշման նոր, պարզ և ճշգրիտ մեթոդի մշակումը և վերջինիս վալիդացիան: Իզոկրատիկ շրջված ֆազային բաժանումն իրականացվել է C18 աշտարակով

*Nucleosil, Macherey-Nagel, 250×4.6 mm, 3 μm)*՝ որպես շարժուն ֆազ կիրառելով ացետոնիտրիլ-ջուր լուծույթը (40:60 ծ/ծ) 1 մլ/րոպե հոսքի արագությամբ: Դետեկտման ալիքի երկարությունը ընտրվել է 300 նմ: Կոլիսիցինը և ընտրված նոր ներքին ստանդարտ ալկարագոլամը լուծահանվել են օգտագործելով  $pH=8.0$  ֆոսֆատային բուֆեր և դիքլորմեթան: Կոլիսիցինի և ալկարագոլամի զսպման ժամանակները համապատասխանաբար կազմում են 5 և 13 րոպե: Ստուգաչափման կորը գծային է 0,1-10 մկգ/մլ կոնցենտրացիայի տիրույթում: Կոլիսիցինի քանակական որոշման ստորին սահման ընտրվել է 0,1 մկգ/մլ: Կոլիսիցինի վերականգնումը գնահատվել է ընդունելի 91.88% արդյունքով: Մեթոդը ընտրողականություն վերաբերյալ ցույց է տվել բավարար արդյունքներ, ինչպես նաև չի նկատվել պլազմայում պարունակվող էնդոգեն միացությունների հետ որևէ ինտերֆերենցիա: Զնչրտությունը (որպես հարաբերական ստանդարտ չեղում, %) և ճշտությունը (որպես հարաբերական սխալ, %) կազմում են համապատասխանաբար 1.23-4.99 և 1.7-4.92%: Կոլիսիցինը լույսից պաշտպանված պայմաններում ցուցաբերել է կայունություն երեք սառեցում-հալեցում ցիկլերից հետո, կայունության նմուշներում կոլիսիցինի վերջնական կոնցենտրացիաները կազմել են 94.7-98.9% ելային արժեքների համեմատ:

Մշակված մեթոդը հաջողությամբ կիրառվել է առողջ կամավորների պլազմայում, ինչպես նաև Թիրախային բժիշկների հանդիսացող արյան մոնոնուկլեար և պոլիմորֆոնուկլեար լեյկոցիտներում կոլիսիցինի քանակական որոշման համար:

## НОВЫЙ, ПРОСТОЙ И ТОЧНЫЙ ВЭЖХ-УФ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛХИЦИНА В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Л. Р. КОЧИКЯН

Научный центр экспертизы лекарств и медицинских технологий  
им. Э.С.Габриеляна

Армения, Ереван, 0051, ул. Комитаса 49/4

E-mail: lilitghochikyan@gmail.com

Настоящая работа описывает разработку и валидацию нового, простого и точного метода определения колхицина в человеческой плазме с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием. Изократичное обращенно-фазовое разделение проводилось на колонке C18 (Nucleosil, Macherey-Nagel, 250×4,6 мм, 3 мкм) с использованием смеси ацетонитрил-вода (40:60 об/об) со скоростью потока 1 мл/мин в качестве подвижной фазы. Обнаружение проводилось при 300 нм. Колхицин и предлагаемый новый внутренний стандарт альпразолам были извлечены из матрицы, используя pH 8,0 фосфатный буфер и дихлорметан. Время удерживания – 5 и 13 мин. для колхицина и альпразолама, соответственно. Калибровочное кривое было линейным в интервале концентраций 0,1-10 мкг/мл. Концентрация 1 мкг/мл была установлена как нижний предел количественного определения колхицина. Возврат был оценен разумным с результатом, равным 91.88%. Метод показал удовлетворительные результаты в отношении селективности, т. к. не наблюдалось интерференции с эндогенными компонентами плазмы. Точность (как относительное стандартное отклонение, RSD %) и правильность (как относительная ошибка, % RE) были в

диапазоне 1.23-4.99 и 1.7-4.92%, соответственно. Было установлено, что колхицин в плазме остался стабильным после трех циклов замораживания-оттаивания в темноте, т. к. конечные концентрации колхицина в образцах стабильности были равны 94.7-98.9 % от исходного значения.

Разработанная методика была успешно применена в анализе колхицина в плазме здоровых добровольцев, а также в клетках-мишенях, таких, как одноядерные и полиморфноядерные лейкоциты крови.

## REFERENCES

- [1] *Cerquaglia C., Diaco M., Nucera M., La Regina M., Montalto M., Manna R.* // *Inflammation and Allergy*, 2005, v. 4, p. 117.
- [2] *Chappey O., Niel E., Dervichian M., Wautier J.L., Scherrmann J.M., Cattani D.* // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1994, v. 38, p. 87.
- [3] *Jiang Y., Wang J., Wang Y., Li H., Fawcett J.P., Gu J.* // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, May, 1,850(1-2):564-8.
- [4] *Cheze M., Deveau M., Pepin G.* // *J. Anal. Toxicol.*, 2006, Oct., 30(8):593-8.
- [5] *Abe E., Lemaire-Hurtel A.S., Duverneuill C., Etting I., Guillot E., de Mazancourt P., Alvarez J.C.* // *J. Anal. Toxicol.*, 2006, Apr., 30(3):210-5.
- [6] *Deveau M., Hubert N., Demarly C.* // *Forensic Sci. Int.*, 2004, Jul 16, 143(2-3):219-22.
- [7] *Ko R.J., Li W.Y., Koda R.T.* // *J. Chromatogr.*, 1990, Feb 23, 525(2):411-8.
- [8] *Clevenger CV, August TF, Shaw LM.* // *J. Anal. Toxicol.*, 1991, May-Jun, 15(3):151-4.
- [9] *FDA* // *Bioanalytical method validation guidance*, 2001, May
- [10] *Ministry of Health of Ukraine* // *Bioanalytical method validation guidance*, 2013.
- [11] *Lidar M., Scherrmann J.M., Shinar Y., Chetrit A., Livneh A.* // *Semin Arthritis Rheum.*, 2004, Feb, 33(4):273-82

**ОРГАНИЧЕСКАЯ И БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**

УДК УДК 547-314

**СИНТЕЗ НЕКОТОРЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ  
НА БАЗЕ 4а,8-ДИМЕТИЛ-3Н,5Н-БИС-СПИРО[ЦИКЛОГЕКСАН-4а,5-  
ДИГИДРОИЗОБЕНЗОФУРО[5,6-с]ФУРАН]-1,7-(3Н,4Н)-ДИОНА  
И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

**Л. Х. ГАЛСТЯН<sup>а</sup>, К. С. АВЕТИСЯН<sup>а</sup>, З. Г. АЛЕБЯН<sup>б</sup> и В. О. ТОПУЗЯН<sup>б</sup>**

<sup>а</sup>Ереванский государственный университет  
Армения, 0025, Ереван, ул. А.Манукяна,1  
E-mail: galstyan\_l@ysu.am

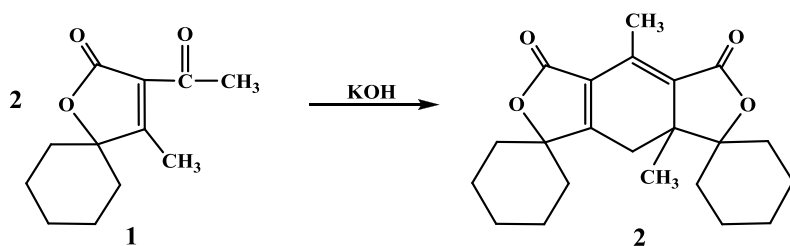
<sup>б</sup>Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии  
НАН Республики Армения  
Институт тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна  
Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Поступило 29 VI 2015

Разработаны оптимальные условия для синтеза 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона, на базе которого по реакции Кинга синтезирован ряд четвертичных аммониевых солей и изучена их антихолинэстеразная и антибактериальная активность. Установлено, что все испытуемые соединения проявляют ингибирующие свойства как по отношению к ацетилхолинэстеразе, так и бутирилхолинэстеразе, а также обладают антибактериальной активностью.

Табл. 2, библиограф. ссылок 8.

Ранее нами было показано, что 3-ацетил-4-метил-5,5-пентаметилеффуран-2(5Н)-он (1) в водном растворе КОН при комнатной температуре в течение 48 ч, вопреки литературным данным [1], образует новую трициклическую конденсированную гетероциклическую систему — 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-дион (2) [2].



В представленной работе изучено влияние природы основания и температуры проведения реакции на выход образующегося соединения 2. В качестве оснований использованы гидроксид натрия, поташ, ацетат натрия, а температура проведения реакции варьировалась в пределах от 40 до 100°C (табл.1).

Таблица 1

**Влияние природы основания и температуры проведения реакции на выход 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона**

| Основание                      | T, °C | Выход, % | Основание | T, °C | Выход, % |
|--------------------------------|-------|----------|-----------|-------|----------|
| КОН                            | 20    | 45       | КОН       | 40    | 45.8     |
| NaOH                           | 20    | 61       | КОН       | 60    | 58.4     |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 20    | 5.6      | КОН       | 80    | 46.1     |
| CH <sub>3</sub> COONa          | 20    | 0        | КОН       | 100   | 42.7     |
| —                              | —     | —        | NaOH      | 60    | 67.7     |

Данные табл. 1 показывают, что наилучшие результаты наблюдаются при использовании в качестве основания гидроксида натрия при температуре проведения реакции 60°C.

Нами изучено также влияние длительности проведения реакции на выход соединения 2. Время проведения реакции варьировалось в пределах от 1 до 10 ч. За ходом реакции следили методом ТСХ. Исследования показали, что образование соединения 2 начинается после 3-часового нагревания, а его выход достигает своего максимального значения — 67.7%, после 9-часового нагревания. Следует отметить, что при нагревании реакционной смеси в течение 10 ч выход соединения 2 понижается.

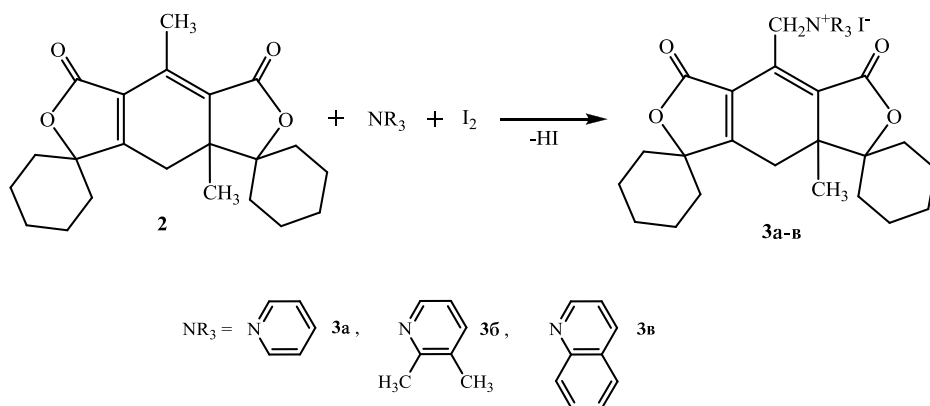
Таким образом, нами найдены оптимальные условия для синтеза соединения 2 — это применение в качестве основания гидроксида натрия и нагревание реакционной смеси при 60°C в течение 9 ч.

Известно, что наблюдаемый при болезни Альцгеймера дефицит ацетилхолина связан с высокой активностью холинэстераз [3]. Применяемые при этой болезни препараты в основном являются ингибиторами ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Между тем, бутирилхолинэстераза (БухЭ),

помимо высокой активности, также способствует накоплению  $\beta$ -амилоидного белка в организме, что характерно для болезни Альцгеймера. Исходя из сказанного очевидно, что создание селективных БУХЭ ингибиторов является важной задачей.

Известно также, что лактонсодержащие соединения обладают антихолинэстеразной активностью [4]. С другой стороны, применяемые в медицине некоторые антихолинэстеразные препараты — это пиридинсодержащие четвертичные аммониевые соли, в частности, применяемый в медицине препарат пиридостигмин — йодметилат 1-метил-3-(диметилкарбамоилокси)пиридина [5].

Исходя из вышесказанного и с целью сочетания двух биологически активных структурных единиц (лактонное и пиридиновое кольца) нами за счет аллильных водородов в положении 8 соединения **2** осуществлена реакция Кинга [6] с некоторыми азотсодержащими гетероциклами (пиридин, 2,3-лутидин, хинолин). Реакция проводилась в условиях кипячения соединения **2** с десятикратным избытком соответствующего амина и йодом в абсолютном этаноле в течение 14 ч. По данным физико-химических исследований установлено, что в результате реакции образуются соответствующие четвертичные аммониевые соли **3а-в**.



Строение полученных солей **3а-в** подтверждено данными ИК- и ЯМР  $^1\text{H}$  спектров, чистота проверена методом ТСХ, состав — элементным анализом.

Изучена антихолинэстеразная и антибактериальная активность соединений **3а-в**. Антихолинэстеразная активность изучена по отношению к АХЭ и БУХЭ, выделенных и очищенных из эритроцитов и плазмы крови человека. Активность холинэстераз измерена по методу Эльмана [7]. Количественная оценка активности проведена с помощью значений  $\text{IC}_{50}$  (концентрация исследуемого соединения, при которой происходит 50% торможение скорости холинэстеразного гидролиза).

Антибактериальная активность изучена по отношению к грамположительным стафилококкам и грамотрицательным палочкам. Исследования проводились по методике [8]. Учет результатов проведен по диаметру (*d*, мм) зоны отсутствия роста микробов на месте нанесения веществ. В качестве положительного контроля использован лекарственный препарат фуразолидон.

Результаты исследования биологической активности соединений **3а-в** приведены в табл. 2.

Таблица 2

Антихолинэстеразная и антибактериальная активность соединений **3а-в**

| Данные исследования антихолинэстеразной активности |                               |                             |      | Данные исследования антибактериальной активности       |    |                   |              |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------|--------------------------------------------------------|----|-------------------|--------------|
| соединение                                         | IC <sub>50</sub> , мМ АХЭ (А) | IC <sub>50</sub> , БуХЭ (Б) | А/Б  | диаметр зоны угнетения роста микробов, мм ( <i>d</i> ) |    |                   |              |
|                                                    |                               |                             |      | Stafylococcus aureus                                   |    | Sh. Flexneri 6858 | E. Coli 0-55 |
|                                                    |                               |                             |      | 209 p                                                  | 1  |                   |              |
| 3а                                                 | 0.036                         | 0.041                       | 0.87 | 25                                                     | 24 | 24                | 22           |
| 3б                                                 | 0.031                         | 0.047                       | 0.66 | 16                                                     | 13 | 15                | 16           |
| 3в                                                 | 0.037                         | 0.012                       | 3.08 | 16                                                     | 13 | 14                | 13           |
| фуразолидон                                        | —                             | —                           | —    | 25                                                     | 24 | 24                | 23           |

Как видно из данных табл. 2, все испытуемые соединения проявляют ингибирующие свойства как по отношению к АХЭ, так и БуХЭ. При этом, если изменение в молекуле испытуемого соединения четвертичной аммониевой структурной единицы не влияет на активность по отношению к АХЭ, то переход от пиридиниевых солей **3а,б** к хинолиниевой соли **3в** сопровождается увеличением активности по отношению к БуХЭ. Кроме того, из величины соотношения А/Б, свидетельствующего о специфичности по отношению к холинэстеразам, следует, что если пиридиниевые соли **2а,б** специфичны по отношению к АХЭ, то хинолиниевая соль **3в** — к БуХЭ. Следует отметить, что активность соединения **3в** в 10 раз превосходит активность применяемого в медицине препарата пиридостигмина, IC<sub>50</sub> которого по отношению к БуХЭ равна 0.1 мМ [5].

Данные антибактериальных исследований соединений **3а-в**, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что все они обладают антибактериальными свойствами. При этом, в отличие от антихолинэстеразной активности, самую высокую антибактериальную активность, равную активности положительного контрольного препарата фуразолидона, проявляет пиридиниевая соль **3а**.

## Экспериментальная часть

ИК-спектры зарегистрированы на спектрометре "Nicollet Avatar 330 – FI-IR" в вазелиновом масле. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  получены на спектрометре "Varian Mercury-300" с рабочей частотой 300 МГц в DMSO- $\text{d}_6$ . Контроль за ходом реакции и чистотой полученных соединений проведен на пластинках "Silufol UV-254", элюент – этанол-бензол (1:2), этанол-гексан (2:1), ацетон-бензол (1:4), проявление – парами йода.

**4а,8-Диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофу-ро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-дион (2).** К раствору 0.02 моля NaOH в 15 мл воды (1.45М) при перемешивании прибавляют 0.02 моля 3-ацетил-4-метил-5,5-пентаметиленфуран-2(5Н)-она (1). Реакционную смесь кипятят 9 ч при 60°C. Осадок отфильтровывают, промывают водой, диэтиловым эфиром и перекристаллизовывают из смеси ацетон-вода (1:4). Выход 67.7%, т. пл. 207-208°C.  $R_f$  0.75 (ацетон-бензол = 1:4).

**Общий метод синтеза йодидов 4а-метил-8-аммонийметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона (3а-в).** Смесь 0.0014 моля йода, 0.0014 моля 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона (2) и 0.014 моля соответствующего амина в 20 мл абсолютного этанола кипятят на водяной бане 14 ч. После отгонки растворителя и избыточного амина остаток промывают бензолом, диэтиловым эфиром и перекристаллизовывают из этанола.

**Йодид 4а-метил-8-пиридинийметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона (3а).** Выход 82%, т.пл. 218-221°C.  $R_f$  0.77 (этанол-гексан = 2:1). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1400 (( $\text{CH}_2$ ) $_5$ -C-O-), 1612 (C=C лакт.), 1620 (C=C- $\text{CH}_2$ ), 1750 (C=O эф.), 2640-2720 (C-N $^+$ ). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{d}_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1.30 с (3 Н,  $\text{CH}_3$ ), 1.43-1.80 м (20 Н, 2 $\times$ C $_6$ H $_{10}$ ), 1.94 д (1 Н,  $\text{CH}_2$ ), 2.19 д (1 Н,  $\text{CH}_2$ ), 2.0 с (2 Н,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 8.22-9.06 м (5 Н $_{\text{пиридин}}$ ). Найдено, %: I 22.75. C $_{27}$ H $_{32}$ O $_4$ NI. Вычислено, %: I 22.60.

**Йодид 4а-метил-8-(2,3-диметил)пиридинийметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона (3б).** Выход 89.7%, т.пл. 188-190°C.  $R_f$  0.16 (этанол-бензол = 1:2). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1420 (( $\text{CH}_2$ ) $_5$ -C-O-), 1610 (C=C лакт.), 1620 (C=C- $\text{CH}_2$ ), 1755 (C=O эф.), 2600-2750 (C-N $^+$ ). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{d}_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1.31 с (3 Н,  $\text{CH}_3$ ), 1.44-1.82 м (20 Н, 2  $\times$  C $_6$ H $_{10}$ ), 1.96 д (1 Н,  $\text{CH}_2$ ), 2.12 с (2Н,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ) 2.20 д (1 Н,  $\text{CH}_2$ ), 2.34 с (3 Н,  $\beta\text{-CH}_3$  лутид.), 2.91 с (3 Н,  $-\text{CH}_3$  лутид.), 7.97-8.95 м (3Н $_{\text{лутид.}}$ ). Найдено, % : I 21.65. C $_{29}$ H $_{36}$ O $_4$ NI. Вычислено, %: I 21.53.

**Йодид 4а-метил-8-хинолинийметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона (3в).** Выход 86%, т.пл. 258-260°C.  $R_f$  0.19 (этанол-бензол = 1:2). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1415 (( $\text{CH}_2$ ) $_5$ -C-

O-), 1615 (C=C лaкт.), 1625 (C=C-CH<sub>2</sub>), 1750 (C=O эф.), 2620-2770 (C-N<sup>+</sup>). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.32 с (3 H, CH<sub>3</sub>), 1.43-1.84 м (20 H, 2×C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>), 1.92 д (1 H, CH<sub>2</sub>), 2.18 д (1 H, CH<sub>2</sub>), 2.20 с (2H, CH<sub>2</sub>-N), 8.10-9.12 м (7H<sub>хинол</sub>). Найдено, %: I 20.97. C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>NI. Вычислено, %: I 20.75.

**4a,8-ԴԻՄԵԹԻԼ-3H,5H-ԲԻՍ-ՍՊԻՐՈ[ՅԻԿԼՈՆԵԶՍԱՆ-4a,5-ԴԻԿԻԴՐՈԻԶՈԲԵՆԶՈԲԵՆՈԲՐՈ[5,6-с]ՖՈՒՐԱՆ]-1,7-(3H,4H)-ԴԻՈՆԻ ԲԱԶԱՅԻ ՈՐՈՇ ՉՈՐՐՈՐԴԱՅԻՆ ԱՄՈՆԻՈԲՍԱՅԻՆ ԱՂԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ**

**L. Խ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Կ. Ս. ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ, Զ. Դ. ՆԱԼԵԲՅԱՆ և Վ. Օ. ԹՈՓՈՒԶՅԱՆ**

*Մշակվել են 4a,8-դիմեթիլ-3H,5H-բիս-սպիրո[ցիկլոհեքսան-4a,5-դիկիդրոիզոբենզոֆուրո[5,6-с]ֆուրան]-1,7-(3H,4H)-դիոնի սինթեզի օպտիմալ պայմաններ և նրա բազայի վրա Կինգի ռեակցիայով սինթեզվել են մի շարք չորրորդային ամոնիումային աղեր: Ուսումնասիրվել է վերջիններիս հակախոլինէսթերազային ակտիվությունը էրիտրոցիտային ԱՆԵ-ի և պլազմային ԲուՆԵ-ի հանդեպ: Համաձայն ստացված արդյունքների, սինթեզված բոլոր միացությունները ցուցաբերում են արգելակիչ հատկություններ ինչպես ԱՆԵ-ի, այնպես էլ ԲուՆԵ-ի հանդեպ: Ուսումնասիրվել է նաև սինթեզված աղերի հակաբակտերիալ ակտիվությունը և պարզվել է, որ նրանք բոլորն օժտված են հակաբակտերիալ ակտիվությամբ ինչպես զրամդոկալան ստաֆիլոկոկների, այնպես էլ գրամբացասական շտամների նկատմամբ:*

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOME QUATERNARY AMMONIUM SALTS ON THE BASIS OF 4a,8-DIMETHYL-3H,5H-BIS-SPIRO[CYCLOHEXANE-4a,5-DIHYDROISOBENZOFURO[5,6-c]FURAN]-1,7-(3H,4H)-DIONE**

**L. Kh. GALSTYAN<sup>a</sup>, K. S. AVETISYAN<sup>a</sup>, Z. G. HALEBYAN<sup>b</sup> and V. O. TOPUZYAN<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Yerevan State University

1, A. Manoukian Str., Yerevan, 0025, Armenia

E-mail: galstyan\_l@ysu.am

<sup>b</sup> The Scientific Technological Centre of Organic and Pharmaceutical Chemistry NAS RA

A.L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry

26, Azatutyan Str., Yerevan, 0014, Armenia

The optimal conditions were worked out for the synthesis of 4a,8-dimethyl-3H,5H-bis-spiro[cyclohexane-4a,5-dihydroisobenzofuro[5,6-c]furan]-1,7-(3H,4H)-dione, on the basis of which some quaternary ammonium salts were synthesized by King's reaction.

The anticholinesterase activity of the synthesized salts in relation to erythrocytic acetylcholinesterase (AChE) and plasmic butyrylcholinesterase (BuChE) was studied. According to the obtained data, all of the synthesized compounds show inhibitory properties in relation to both AChE and BuChE.

The antibacterial activity of the synthesized salts was also studied and it was found that all of them showed antibacterial activity in relation to both gram positive staphylococci and gram negative strains.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Аветисян А.А., Джанджапанян А.Н., Акопян З.А., Товмасын Н.Г.* // Арм. хим. ж., 1983, т. 36, №12, с. 767.
- [2] *Галстян Л.Х., Аветисян К.С., Тамазян Р.А., Айвазян А. Г.* // ЖОрХ, 2014, т.50, вып.3, с. 405. [Russian Journal of Organic Chemistry, 2014, v. 50, №3, p. 394].
- [3] *Gauthier S., Gelinas I., Gauthier L.* // Int. Psychogeriatr., 1997, v. 9, p. 163.
- [4] *Carolan C.G., Dillon G.P., Gaynor J.M., Reidy S., Ryber S.A., Khau D., Marguez J.F., Gilmer J.F.* // J.Med.Chem., 2008, v. 51, №20, p. 6400.
- [5] *Leader H., Wolfe A.D., Ching P.K., Gordon R.K.* // J. Med. Chem., 2002, v. 45, p. 902.
- [6] *Вацуро К.В., Миценко Г.Л.* Именные реакции в органической химии. М., Химия, 1976, 304 с.
- [7] *Elman G.L., Coutney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M.* // Biochem. Pharmacol., 1961, v. 7, p. 88.
- [8] *Перишин Г.Н.* Методы экспериментальной химиотерапии. М., Мир, 1971, 507 с.

**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 5-([1,3,5]-ТРИАЗИНИЛТИОАЛКИЛ)-  
[1,3,4]-ОКСАДИАЗОЛ-3H-2-ТИОНОВ**

Э. Н. АМБАРЦУМЯН<sup>1</sup>, А. С. ВОРСКАНЯН<sup>1</sup>, А. А. ГРИГОРЯН<sup>2</sup> и А. П. ЕНГОЯН<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный аграрный университет Армении  
Армения, 0009, Ереван, ул. Теряна, 74

<sup>2</sup>ГОУ ВПО Российско-Армянский (Славянский) университет  
Армения, 0051, Ереван, ул. О.Эмина, 123  
E-mail: ayengoyan(@)mail.ru

Поступило 30 VI 2015

Взаимодействием гидразидов 4,6-алкил(диалкил)амино-[1,3,5]-триазин-2-ил-тиоалкан-карбоновых кислот с сероуглеродом в присутствии едкого кали синтезированы 5-(((4,6-алкил(диалкил)амино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)алкил)-[1,3,4]-оксадиазол-3H-2-тионы. Последние действием едкого кали переведены в соответствующие соли тиолов, образующие с алкилгалогенидами соответствующие 2-S-алкилпроизводные. Взаимодействием тех же тионов с 2,4-дихлор-6-метилпиримидином получены неконденсированные трициклические 2-(2-хлор-6-метилпиримидин-4-ил)тиопроизводные. Реакцией же исходных гидразидов с монохлоруксусной кислотой получены 2-((хлорметил)тио)-5-(((4,6-диалкиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазолы.

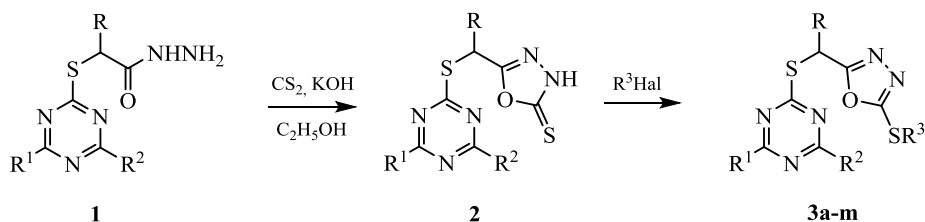
Библ. ссылок 12.

Замещенные [1,3,5]-триазины применяются в сельском хозяйстве главным образом в качестве гербицидов. Производные пятичленных гетероциклических соединений (оксадиазола, тиадиазола и др.) более активны по отношению к растениям, чем к насекомым и клещам, вследствие чего они используются в качестве гербицидов, фунгицидов и регуляторов роста растений [1,2]. Арсенал применяемых в сельском хозяйстве химических средств защиты растений на основе [1,3,4]-оксадиазола довольно ограничен. Из их числа можно выделить селективный гербицидный препарат (3,4-дихлорфенил)-4-метил-[1,3,4]-оксазолидин-2,5-дион (метазол-2), гербициды димефурон, оксадиаргил, оксадиазон и инсектицид метоксадиазон [2]. Между тем, значительный интерес могут

представлять практически не исследованные гетероциклические системы с сочетанием в молекулах [1,3,4]-оксадиазольного и [1,3,5]-триазинового циклов, по отношению к которым со стороны вредителей и болезней растений еще не возникла резистентность.

Исходя из сказанного в поисках новых физиологически активных соединений нами осуществлено взаимодействие ранее полученных гидразидов 4,6-бис-алкил(диалкил)амино-[1,3,5]-триазин-2-илтиоалканкарбоновых кислот (**1**) [3] с сероуглеродом в щелочной среде. В литературе описаны реакции гидразидов различных карбоновых кислот с сероуглеродом в щелочной среде, приводящие к образованию меркаптооксадиазолов [4-9].

Многочисленными опытами нами показано, что реакции указанных гидразидов с сероуглеродом протекают наилучшим образом в среде абсолютного этанола в присутствии едкого кали в условиях кипячения реагентов в соотношении 1:1:2 (гидразид:KOH:CS<sub>2</sub>) в течение 5-6 ч до прекращения выделения H<sub>2</sub>S. При этом получают 5-(((4,6-бис-алкил(диалкил)амино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)алкил)-[1,3,4]-оксадиазол-3H-2-тионы (**2**).



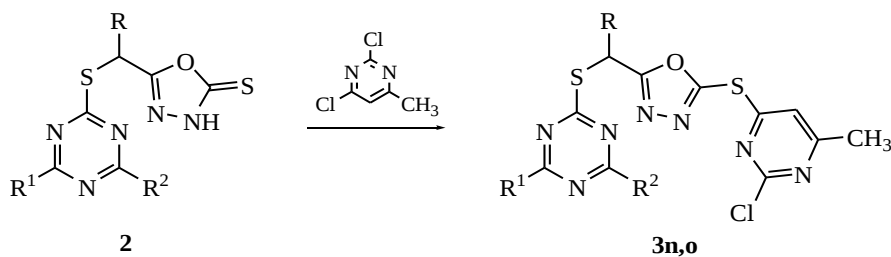
R = H, CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, i-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NH, морфолил; R<sub>2</sub> = N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, морфолил;  
R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>

Соединения **2** могут существовать в тионной или тиольной таутомерных формах. В ряде наших ранних работ было показано, что эти соединения так же, как и соответствующие 1,3,4-тиадиазольные производные, имеют тионную структуру [10-12]. В спектрах ЯМР <sup>1</sup>H соединений **2** химический сдвиг подвижного протона оксадиазольного цикла наблюдается в слабопольной области 12.75-14.25 м.д., что может соответствовать только протону NH группы.

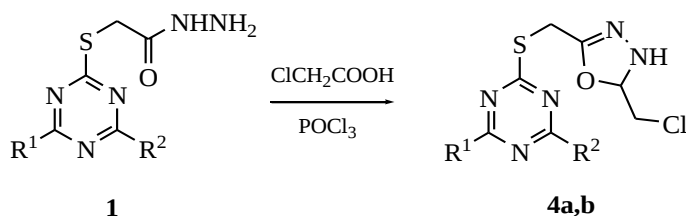
С целью расширения ассортимента новых эффективных препаратов в ряду оксадиазольных производных нами из триазиноксадиазол-2-тионов в щелочной среде получены соответствующие соли, образующие с различными алкилирующими агентами S-алкилпроизводные оксадиазолов **3a-m**. Об этом свидетельствуют химические сдвиги сигналов вводимых алкильных групп.

С целью введения в молекулу фармакофорного азинового цикла осуществлена реакция солей соединений **2** с 2,4-дихлор-6-метилпирими-

дином, приводящая к соответствующим 2-(2-хлор-6-метилпиримидин-4-ил)тиопроизводным (**3n,o**).



Осуществлено также взаимодействие исходных гидразидов (**1**) с монохлоруксусной кислотой в присутствии  $\text{POCl}_3$ , приводящее к 2-((хлор-метил)тио)-5-(((4,6-бис-алкил(диалкил)амино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазолам (**4a,b**).



При предварительных лабораторно-вегетационных испытаниях синтезированные соединения **2-4** проявили ярко выраженное стимулирующее действие на рост растений. Из них наиболее эффективными оказались соединения **2b**, **2c**, **2f**, **3f**, **3g**, **3i** и **3n**, активность которых колебалась в интервале 82-98% по сравнению с широко применяемым гетероауксином.

## Экспериментальная часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  сняты на приборе "Mercury 300 МГц" в растворе  $\text{DMSO-d}_6 + \text{CCl}_4$  (1:3). Масс-спектры зарегистрированы на спектрометре "Agilent LC-MS G1946B". ТСХ проведена на пластинках "Silufol UV-254", элюент — ацетон-гексан (1:2), проявитель — смесь 2%  $\text{AgNO}_3 + 0.4\%$  бромфенолового синего + 4% лимонной кислоты.

**Синтез соединений 2.** К 0.001 моля гидразидов 4,6-алкил(диалкил)амино-[1,3,5]-триазин-2-ил-тиоалканкарбоновых кислот в 5 мл абс. этанола прибавляют 0.001 моля  $\text{KOH}$ , растворенного в 3-4 мл абс. этанола, затем 0.13 мл (0.002 моля) сероуглерода и смесь кипятят в течение 5 ч до прекращения выделения  $\text{H}_2\text{S}$ . Удаляют 2/3 части растворителя, остаток растворяют в 5-7 мл воды и подкисляют  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Полученные кристаллы оксадиазолов **2** фильтруют, промывают водой и сушат на воздухе.

**5-(((4,6-бис-Диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2a).** Выход 87%, т.пл. 203-204°C. Найдено, %: N 31.70; S 19.9.  $C_{10}H_{15}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 31.28; S 20.46. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 3,10 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 4,27 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 13,0 (ш.с., 1H, NH-оксадиазол). MS: 314 (M+1).

**5-(((4,6-бис-Изопропиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2b).** Выход 88%, т.пл. 150-152°C. Найдено, %: N 28.91; S 18.32.  $C_{12}H_{19}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 28.71; S 18.78. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,10-1,24 [м, 12H,  $(CH_3)_4-i-Pr$ ]; 4,12 (м, 2H,  $CH-i-Pr$ ); 4,27 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 12,75 (ш.с, 1H, NH-оксадиазол).

**5-(((4-Морфолино-6-изобутиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2c).** Выход 90%, т.пл. 168-69°C. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.,  $\Gamma$ : 0,9 [д, J=6.9, 3H,  $(CH_3)_2-i-Bu$ ]; 1.87 (м, 1H,  $CH-i-Bu$ ); 3.08 (м, 2H,  $NCH_2-i-Bu$ ); 3.55-3.80 (м, 8H, морфолил); 4.30 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 6.90 и 7.28 (т, J=5,8, 1H, NH-*i-Bu*); 14.12 (уш.с, 1H, NH-оксадиазол). Найдено, %: N 25.77; S 16.30.  $C_{14}H_{21}N_7O_2S_2$ . Вычислено, %: N 25.57; S 16.72.

**5-(((4-Морфолино-6-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2d).** Выход 95%, т.пл. 173-74°C. Найдено, %: N 27.25; S 17.65.  $C_{12}H_{17}N_7O_2S_2$ . Вычислено, %: N 27.60; S 18.02. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 3.08 [с, 6H,  $N(CH_3)_2$ ]; 3.57-3.80 (м, 8H, морфолил); 4.28 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 14.15 (уш.с, 1H, NH).

**5-(((4,6-бис-Морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2e).** Выход 78%, т.пл. 225-227°C. Найдено, %: N 24.28; S 16.93.  $C_{14}H_{19}N_7O_3S_2$ . Вычислено, %: N 24.68; S 16.40. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 3.57-3.80 (м, 16H, морфолил); 4.29 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 14,10 (уш.с. 1H, NH).

**5-(1-((4,6-бис-Диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2f).** Выход 80%, т.пл. 199-200°C. Найдено, %: N 29.61; S 19.09.  $C_{11}H_{17}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 29.94; S 19.59. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.,  $\Gamma$ : 1.73 (д, J=6.8,  $\underline{CH_3}CHS$ ); 3.10 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 5.18 (к, J=6,8,  $SCH$ ); 14.05 (уш.с, 1H, NH). MS: 328 (M+1).

**5-(1-((4-Этиламино-6-изопропиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2g).** Выход 73%, т.пл. 159-160°C. Найдено, %: N 28.42; S 18.54.  $C_{12}H_{19}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 28.77; S 18.76. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.,  $\Gamma$ : 1.10-1.25 [м, 9H,  $(CH_3)_2-i-Pr$  и  $NCH_2\underline{CH_3}$ ]; 1.75 (д, J=6.8,  $\underline{CH_3}CHS$ ); 4.05-4.20 (м, 2H,  $CH-i-Pr$ ); 5,20 (м, 1H,  $SCH$ ); 6.55-6.97 [2H, (NH) $_2$ ]; 12.45 (ш.с, 1H, NH).

**5-(1-((4,6-бис-Изопропиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2h).** Выход 90%, т.пл. 115-117°C. Найдено, %: N 27.83; S 17.79.  $C_{13}H_{21}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 27.59; S 18.02. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.,  $\Gamma$ : 1,10-1,22 [м, 12H,  $[CH_3]_4-i-Pr$ ]; 1.73 (д, J=6.8,  $\underline{CH_3}CHS$ ); 4.10 (м, 2H,  $CH-i-Pr$ ); 5,08 и 5,23 (м, 1H,  $SCH$ ); 6.43, 6.52, 6.80 и 6.84 [д, J=6,8, (NH) $_2-i-Pr$ ]; 14.10 (ш.с, 1H NH).

**5-(1-((4-Метиламино-6-морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2i).** Выход 85%, т.пл. 206-208°C. Найдено, %: N 27.25; S 18.65.  $C_{12}H_{17}N_7O_2S_2$ . Вычислено, %: N 27.60; S 18.02. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$  м.д., Гц: 1.75 (д, J=6.8, 3H,  $CH_3CHS$ ); 3.20 (д, J=5.7, 3H,  $NCH_3$ ); 3.60-3.80 (м, 8H, морфолил); 5.23 (к, J=6.8, 1H, SCH); 7.22 и 7.38 (к, J=5.7, 1H,  $NHCH_3$ ); 14.12 (уш.с, 1H, NH).

**5-(1-((4,6-бис-Морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тион (2j).** Выход 89%, т.пл. 193-94°C. Найдено, %: N 23.55; S 15.57.  $C_{15}H_{21}N_7O_3S_2$ . Вычислено, %: N 23.84; S 15.57. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$  м.д., Гц: 1.73 (д, J=6.8,  $CH_3CHS$ ); 3.60-3.80 (м, 16H, морфолил); 5.26 (к, J=6.8, 1H, SCH); 13.70 (уш.с, 1H, NH).

**Синтез соединений 3а-е.** К суспензии 0.38 г (0.0055 моля) измельченно-го едкого кали в 10 мл сухого ацетона прибавляют 0.0055 моля соединения 2 и смесь перемешивают при комнатной температуре 1-2 ч. К полученной соли при охлаждении холодной водой прибавляют 0.7 г (0.0055 моля) диметилсульфата и смесь нагревают при 45-50°C 6-7 ч. Удаляют растворитель, остаток протирают водой, полученные кристаллы отфильтровывают и промывают разбавленным раствором КОН. Продукты 3а-е перекристаллизовывают из смеси ацетон-гексан (1:2).

**2-(((4,6-бис-Диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-5-(метилтио)-[1,3,4]-оксадиазол (3а).** Выход 80%, т.пл. 120-122°C. Найдено, %: N 29.62; S 18.95.  $C_{11}H_{17}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 29.94; S 19.59. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 2.69 (с, 3H,  $SCH_3$ ); 3.10 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 4.42 (с, 3H,  $SCH_2$ ).

**2-(((4-Морфолино-6-изобутиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-5-(метилтио)-[1,3,4]-оксадиазол (3b).** Выход 55%, т.пл. 102-104°C. Найдено, %: N 24.92; S 15.83.  $C_{15}H_{23}N_7O_2S_2$ . Вычислено, %: N 24.68; S 16.12. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д., Гц: 0.92 [д, J=6.9, 6H,  $(CH_3)_2-i-Bu$ ]; 1.87 (м, 1H,  $CH-i-Bu$ ); 2.70 (с, 3H,  $SCH_3$ ); 3.12 (м, 2H,  $NCH_2-i-Bu$ ), 3.57-3.75 (м, 8H, морфолил); 4.28 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 6.80 и 7.18 (т, J=5.9, NH).

**2-(((4,6-бис-Морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-5-(метилтио)-[1,3,4]-оксадиазол (3с).** Выход 60%, т.пл. 160-161°C. Найдено, %: N 23.54; S 15.22.  $C_{15}H_{21}N_7O_3S_2$ . Вычислено, %: N 23.84; S 15.57. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 2.72 (с, 3H,  $SCH_3$ ); 3.60-3.76 (м, 16H, морфолил); 4.25 (с, 2H,  $SCH_2$ ).

**2-(1-((4,6-бис-Диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-5-(метилтио)-[1,3,4]-оксадиазол (3d).** Выход 73%, т.пл. 105-107°C. Найдено, %: N 28.43; S 18.16.  $C_{12}H_{19}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 28.73; S 18.78. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д., Гц: 1.76 (д, J=7.0, 3H,  $CH_3CHS$ ); 2.70 (с, 3H,  $SCH_3$ ); 3.10 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 5.18 (к, J=7.0, SCH).

**2-(1-((4,6-бис-Морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-5-(метилтио)-[1,3,4]-оксадиазол (3е).** Выход 85%, т.пл. 167-169°C. Найдено, %: N 22.75; S 14.65.  $C_{16}H_{23}N_7O_3S_2$ . Вычислено, %: N 23.05, S 15.05. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д., Гц: 1.75 (д, J=7.4, 3H,  $CH_3$ ); 2.70 (с, 3H,  $SCH_3$ ); 3.57-3.78 (м, 16H, морфолил); 5.06 (к, J=7.4, 1H, CH). MS: 426 (M+1).

**Синтез соединений 3f-m.** К суспензии 0.35 г (0.0055 моля) измельченного едкого кали в 10 мл сухого ацетона прибавляют 0.0055 моля соединения **2** и смесь перемешивают при комнатной температуре 1-2 ч. К полученной соли при охлаждении холодной водой прибавляют 0.0055 моля хлорацетамида (метилхлорацетата или 4-хлорбензилхлорида), 1 г (0.0055 моля) NaI·2H<sub>2</sub>O и смесь нагревают при 55-60°C в течение 6-7 ч. Удаляют растворитель, остаток протирают водой, полученные кристаллы отфильтровывают, промывают разбавленным раствором КОН. После высушивания перекристаллизовывают из смеси ацетон-гексан (1:2).

**2-((5-(((4,6-бис-Диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетамид (3f).** Выход 71%, т.пл. 165-167°C. Найдено, %: N 30.72; S 17.85. C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 30.27; S 17.29. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д.: 3.10 [с, 12H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]; 3.97 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>CO); 4.42 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>); 7.43 и 7.58 (уш.с, 2H, NH<sub>2</sub>).

**2-((5-(((4-Изобутиламино-6-морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетамид (3g).** Выход 55%, т.пл. 179-180°C. Найдено, %: N 24.85; S 15.07. C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 25.45; S 14.54. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д., Гц: 0.92 [Δ, J=6.9, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-i-Bu]; 1.87 (м, 1H, CH-i-Bu); 3.12 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>-i-Bu); 3.57-3.75 (м, 8H, морфолил); 3.97 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>CO); 4.28 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>); 6.80 и 7.18 (т, J=5.9, 1H, NH); 7.43 и 7.58 (уш.с, 2H, NH<sub>2</sub>).

**2-((5-(((4-Диметиламино-6-морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетамид (3h).** Выход 57%, т.пл. 168-170°C. Найдено, %: N 27.43; S 15.06. C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 27.18; S 15.53. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д.: 3.09 [с, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; 3.54-3.78 (м, 8H, морфолил); 3.97 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>CO); 4.25 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>); 7.09 и 7.55 (уш.с, 2H, NH<sub>2</sub>).

**2-((5-(1-((4,6-бис-Диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетамид (3i).** Выход 65%, т.пл. 158-159°C. Найдено, %: N 28.87; S 16.08. C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 29.16; S 16.66. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д., Гц: 1.75 (Δ, J=7.4, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.10 [с, 12H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; 3.97 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>CO); 5.06 (к, J=7.4, 1H, CH); 7.35 и 7.60 (уш.с, 2H, NH<sub>2</sub>).

**2-((5-(1-((4,6-бис-Морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетамид (3j).** Выход 65%, т.пл. 187-188°C. Найдено, %: N 30.11; S 17.85. C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 30.43; S 17.39. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д., Гц: 1.75 (Δ, J=7.3, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.57-3.78 (м, 16H, морфолил); 3.98 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>CO); 5.07 (к, J=7.3, 1H, CH), 7.09 и 7.55 (уш.с, 2H, NH<sub>2</sub>).

**Метил 2-((5-(((4,6-бис-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетат (3k).** Выход 70%, т.пл. 87-88°C. Найдено, %: N 25.75; S 16.12. C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 24.45; S 16.61. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д.: 3.10 [с, 12H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]; 3.73 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.08 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>CO); 4.25 (с, 2H, SCH<sub>2</sub>).

**Метил 2-((5-(((4,6-бис-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)этил)-[1,3,4]-оксадиазол-2-ил)тио)ацетат (3l).** Выход 85%, т.пл. 109-110°C. Найдено, %: N

24.25; S 15.71.  $C_{14}H_{21}N_7O_3S_2$ . Вычислено, %: N 24.56; S 16.04. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д., Гц: 1.77 (д, J=7.3, 3H,  $CH_3$ ); 3.09 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 3.73 (с, 3H,  $OCH_3$ ); 4.08 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 5.15 (к, J=7.3, 1H, CH).

**2-((4-Хлорбензил)тио)-5-(((4,6-бис-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол (3m).** Выход 64%, т.пл. 140-142°C. Найдено, %: N 22.75; S 14.12.  $C_{17}H_{20}N_7OS_2$ . Вычислено, %: N 22.4; S 14.62. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 3.09 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 4.05 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 4.25 (с, 2H,  $SCH_2Bz$ ); 7.18-7.32 (м, 5H,  $C_6H_4$ ).

**Синтез соединений 3n,о.** К 0.002 моля калиевой соли соединения 2 (полученного из 0.002 моля соединения 2 и 0.002 моля КОН в 3-4 мл воды с последующим высушиванием на водяной бане) в 5-6 мл ДМФА прибавляют 0.0025 моля 2,6-дихлор-4-метил-1,3-пиримидина и смесь нагревают при 60-65°C в течение 6-7 ч. Удаляют растворитель, остаток обрабатывают водой, отфильтровывают, промывают разбавленным раствором КОН и после высушивания обрабатывают гексаном.

**2-((2-Хлор-6-метилпиримидин-4-ил)тио)-5-(((4,6-бис-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол (3n).** Выход 68%, т.пл. 152-153°C. Найдено, %: N 28.27; S 14.19.  $C_{15}H_{18}ClN_9OS_2$ . Вычислено, %: N 28.65; S 14.56. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 2.43 (с, 3H,  $CH_3$ -пиримидин); 3.09 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 4.55 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 7.32 (с, 1H, CH-пиримидин). MS: 440 и 442 (M+1).

**2-((2-Хлор-6-метилпиримидин-4-ил)тио)-5-(((4,6-бис-морфолино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол (3o).** Выход 60%, т.пл. 179-180°C. Найдено, %: N 24.39; S 11.79.  $C_{19}H_{22}ClN_9O_3S_2$ . Вычислено, %: N 24.06; S 12.22. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 2.42 (с, 3H,  $CH_3$ ); 3.58-3.75 (м, 16H, морфолил); 4.55 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 7.32 (с, 1H, CH-пиримидин).

**Синтез соединений 4a,b.** Смесь 0.005 моля соединения 1 и 0.0053 моля монохлоруксусной кислоты в 2.5 мл  $POCl_3$  нагревают при 40-50°C, затем при 70-80°C в течение 5-6 ч. Смесь наливают на лед, нейтрализуют  $Na_2CO_3$  и полученные кристаллы отфильтровывают.

**2-((Хлорметил)тио)-5-(((4,6-бис-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол (4a).** Выход 73%, т.пл. 110-112°C. Найдено, %: N 29.35; Cl 10.28.  $C_{11}H_{16}ClN_7OS$ . Вычислено, %: N 29.74; Cl 10.77. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 3.10 [с, 12H,  $N(CH_3)_4$ ]; 4.48 (с, 2H,  $SCH_2$ ); 4.82 (с, 2H,  $ClCH_2$ ).

**2-((Хлорметил)тио)-5-(((4-морфолино-6-диметиламино-[1,3,5]-триазин-2-ил)тио)метил)-[1,3,4]-оксадиазол (4b).** Выход 60%, т.пл. 230-231°C. Найдено, %: N 26.77; Cl 9.03.  $C_{13}H_{18}ClN_7O_2S$ . Вычислено, %: N 26.37; Cl 9.55. Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 3.14 [с, 6H,  $N(CH_3)_2$ ]; 3.60-3.75 (м, 8H, морфолил); 4.45 (с, 2H,  $SCH_2$ ), 4.80 (с, 2H,  $ClCH_2$ ).

## 5-([1,3,5]-ՏՐԻԱԶՈԼՆԻԼԹԻՈԱԿԻԼ)-[1,3,4]-ՕՔՍԱԴԻԱԶՈԼ-3H-2-ԹԻՈՆՆԵՐԻ ԱԾԱՆՅՅԱԼՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԸ

Է. Ն. ՀԱՄԲԱՐԴՉՈՒՄՅԱՆ, Ա. Ս. ՎՈՐՍԿԱՆՅԱՆ,  
Ա. Ա. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ և Ա. Փ. ԵՆԳՈՅԱՆ

Կծու կալիումի ներկայությամբ 4,6-ալկիլ(դիալկիլ)ամինա-[1,3,5]-տրիազին-2-իլթիո-ալկանկարբոնաթթուների հիդրազիդների և ծծմբածխածնի փոխազդեցությամբ սինթեզվել են (((4,6-ալկիլ(դիալկիլ)ամինա-[1,3,5]-տրիազին-2-իլ)թիո)ալկիլ)-[1,3,4]-օքսադիազոլ-3H-2-թիոնները: Վերջինները ալկալիների հետ առաջացնում են թիոլների համապատասխան աղերը, որոնք ռեակցելով ալկիլհալոգենիդների հետ գոյացնում են 2-S-ածանցյալներ: Նույն թիոնների և 2,4-դիքլոր-6-մեթիլպիրիմիդինի փոխազդեցությամբ սինթեզվել են համապատասխան չկոնդենսված եռցիկիկ 2-(2-քլոր-6-մեթիլպիրիմիդին-4-իլ)թիոածանցյալները: Ելային հիդրազիդների ռեակցիան մոնոքլորքացախաթթվի հետ հանգեցնում է 2-((քլորմեթիլ)թիո)-5-(((4,6-դիալկիլամինա[1,3,5]-տոլիազին-2-իլ)թիո)մեթիլ)-[1,3,4]-օքսադիազոլների առաջացմանը:

## SYNTHESIS OF 5-([1,3,5]TRIAZINYLTHTIOALKYL)-[1,3,4]-OXADIAZOLE-3H-2-THIONES DERIVATIVES

E. N. HAMBARDZUMYAN<sup>1</sup>, A. S. VORSKANYAN<sup>1</sup>,  
A. A. GRIGORYAN<sup>2</sup> and A. P. YENGOPYAN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>National Agrarian University of Armenia  
74, Teryan Str., Yerevan, 0009, Armenia

<sup>2</sup>Russia-Armenian (Slavonic) University  
123, H.Emin Str., Yerevan, 0051, Armenia

Fax: +37410 567079; E-mail: ayengoyan@mail.ru

By the interaction of (4,6-alkyl(dialkyl)amino-[1,3,5]triazin-2-yl)-thioalkan-carboxylic acids hydrazides with carbon disulfide in the presence of potassium hydroxide 5-(((4,6-alkyl(dialkyl)amino-[1,3,5]triazin-2-yl)thio)alkyl)-[1,3,4]oxadiazole-3H-2-thiones were synthesized. The latter with caustic base form the corresponding thiols salts, which when reacted with alkyl halides afford 2-S-alkyl derivatives. The reaction of the same thiones with 2,4-dichloro-6-methylpyrimidine leads to corresponding unfused tricyclic 2-(2-chloro-6-methylpyrimidin-4-yl)thio derivatives. The starting hydrazides with monochloroacetic acid form 2-((chloromethyl)thio)-5-(((4,6-dialkylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)thio)methyl)-[1,3,4]oxadiazoles.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Мельников Н.Н. Пестициды. М., Химия, 1987, с. 610.
- [2] Мельников Н.Н. Химия и технология пестицидов. М., Химия, 1974, с. 657.
- [3] Довлатян В.В., Амбарцумян Э.Н., Ворсканян А.С., Амазаспян Г.С., Енгоян А.П. // Хим. ж. Армении, 2006, т. 59, №4, с. 120.
- [4] Srivastava M., Singh D., Gokulan P.D. // J. Curr. Pharm. Res., 2010, №4, p. 20.
- [5] Sahar Yar M., Ahmad Saidigui A., Ashraf Ali M. // J. Chin. Chem. Soc., 2007, v. 54, №1, p. 5.
- [6] Valentina P., Liango K., Deepthi M., Harysha P., Pavani G. // J. Pharm. Sci. Res., 2009, v. 1, №2, p. 74.

- [7] *Salimon I., Salih N., Hameed A., Yousif E.* // J. Appl. Sci. Res., 2010, v. 6, №7, p. 866.
- [8] *Dewangan D., Pandey A., Sivakumar T., Rajaval R., Dhar D.R.* // Int. J. Chem. Tech. Res., 2010, v. 2, №3, p. 1397.
- [9] *Авакян А.С., Вартанян С.О., Саркисян А.Б., Маркарян Э.А.* // Хим. ж. Армении, 2006, т. 59, №4, с. 130.
- [10] *Eliazyan K.A., Hakobyan R.S., Pivazyan V.A., Ghazaryan E.A., Harutyunyan S.V., Yengoyan A.P.* // Heterocycl. Commun., 2013, v. 19, №4, p. 275.
- [11] *Князян А.М., Eliazyan K.A., Pivazyan V.A., Ghazaryan E.A., Harutyunyan S.V., Yengoyan A.P.* // J. Heterocycl. Chem., 2013, v. 50, №6, p. 1281.
- [12] *Князян А.М., Eliazyan K.A., Pivazyan V.A., Ghazaryan E.A., Harutyunyan S.V., Yengoyan A.P.* // Heterocycl. Commun., 2012, v. 18, №2, p. 103.

**СИНТЕЗ, ПРЕВРАЩЕНИЯ 4'-АМИНО-1'Н-СПИРО[ЦИКЛОГЕКСАН-  
1,2'-НАФТАЛИН]-3'-КАРБОКСАМИДА И ИЗУЧЕНИЕ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

**Н. П. ГРИГОРЯН, А. С. ГРИГОРЯН, Р. Г. ПАРОНИКЯН и Р. С. СУКАСЯН**

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии  
НАН Республики Армения  
Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна  
Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26  
E-mail: nver-55@ mail.ru

Поступило 1 X 2015

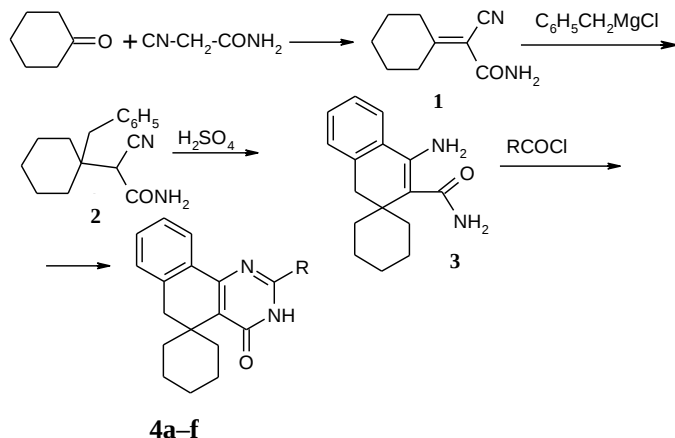
Взаимодействием цианацетамида с циклогексаноном получен 2-циан-2-циклогексиденацетамид, реагирующий далее с бензилмагнийхлоридом с образованием с высоким выходом 2-(1-бензилциклогексил)-2-цианацетамида. Установлено, что последний под действием серной кислоты циклизуется в 4'-амино-1'Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамида, реагирующий с хлорангидридами большого ряда карбоновых кислот с образованием соответствующих спиробензо[h]хиназолинов. Щелочным гидролизом 4'-(3-бензоилтиоуреидо)-1'Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамида получен 1'Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-4'(3'Н)-он. Изучена противосудорожная и антидепрессивная активность синтезированных соединений.

Библ. ссылок 10.

Из литературных данных известно, что производные бензохиназолинов обладают противоопухолевыми [1-5] и психотропными [6,7] свойствами. В продолжение исследований по созданию новых биологически активных спиробензо[h]хиназолинов нами осуществлен синтез дигидронафталина, содержащего во втором положении карбоксамидную группу. В качестве исходных веществ служили цианацетамид и циклогексанон. В условиях реакции Кневенагеля нами получен с высоким выходом 2-циан-2-циклогексиденацетамид (**1**), взаимодействием которого с бензилмагнийхлоридом образуется 2-(1-бензилциклогексил)-2-цианацетамид (**2**), зациклизованный далее в присутствии серной кислоты в

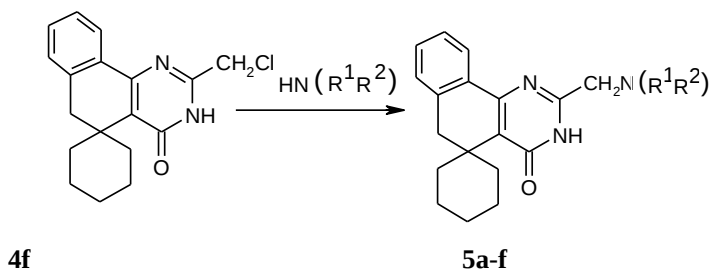
4'-амино-1'-Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамид (**3**). Установлено, что реакция последнего с хлорангидридами карбоновых кислот (уксусная, пропионовая, масляная, бензойная и фенилуксусная) сопровождается циклизацией образующихся промежуточных соединений в 2-алкил(арил)замещенные бензо[*h*]хиназолины (**4a-f**). Структуры последних по своим физико-химическим показателям идентичны структурам соединений, полученных ранее в нашей лаборатории [8].

Таким образом, исходя из цианацетамида и циклогексанона нами разработан более удобный метод синтеза вышеуказанных спиробензо[*h*]хиназолинов (**4a-f**),



R = CH<sub>3</sub> (**4a**); R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (**4b**); R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (**4c**); R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**4d**); R = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**4e**); R = CH<sub>2</sub>Cl (**4f**).

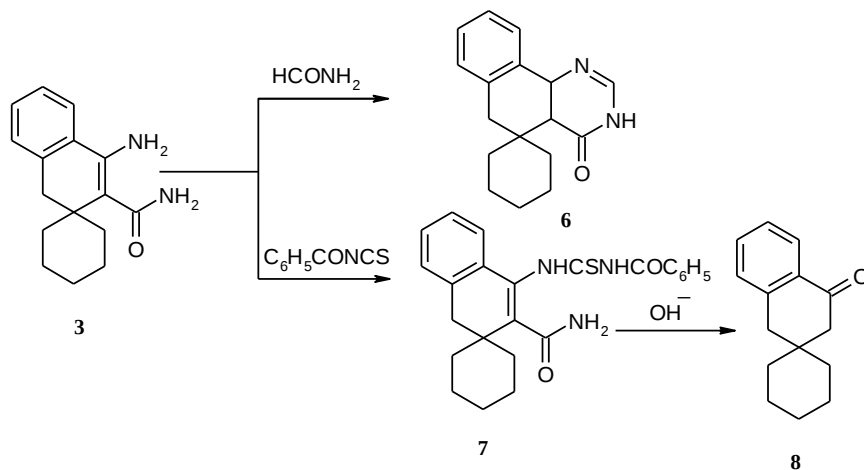
Далее на базе 2-(хлорметил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-она (**4f**) нами получены 2-(аминометилзамещенные)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-оны (**5a-f**).



R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (**5a**); R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = фенил (**5b**); R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = 4-хлорфенил (**5c**); R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = 2,5-дихлорфенил (**5d**); R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = циклогексил (**5e**); R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (**5f**).

Взаимодействием aminoаида **3** с формамидом нами получен 3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (**6**), а с бензоилизотиоцианатом — 4'-(3-бензоилтиоуреидо)-1'-Н-спиро[циклогексан-1,2'-наф-

талин]-3'-карбоксаимид (7), щелочной гидролиз которого в этаноле привел к 1'-Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-4'(3'H)-ону (8).



Изучена противосудорожная активность соединений **1-3**, **4a-f**, **5a-f** и **6-8** по тесту коразоловых клонических судорог (коразол вводили в дозе 90 мг/кг подкожно), которые являются моделью абсансов и малых приступов эпилепсии. Изучено также миорелаксантное побочное действие этих соединений по тесту „вращающегося стержня”. В дозе 25 мг/кг (внутрибрюшинно) на белых беспородных мышах массой 18-24 г в виде суспензии с твин-80 названные соединения по антагонизму с коразолом проявляют слабую от 20 до 40% эффективность.

В опытах *in vitro* исследовано влияние соединений **1-3** и **4a-c** на активность моноаминоксидазы (МАО) мозга крыс. В качестве субстрата использовали серотонин (5-ОТ). Все соединения изучены в концентрации 1 мкмоль/мл пробы. Активность МАО определяли в 50% гомогенатах мозга [9]. Полученные результаты обработаны статистически [10].

Установлено, что среди исследованных веществ только **2** и **3** достоверно угнетают активность МАО на 53 и 56%, соответственно.

## Экспериментальная часть

ИК-спектры сняты на спектрометре “UR-20” (в вазелиновом масле), спектры ЯМР  $^1\text{H}$  – на приборе “Mercury 300”, Varian (300, 077 МГц) в ( $\text{DMSO-d}_6$ ), внутренний стандарт – ТМС. Тонкослойная хроматография проведена на пластинках “Silufol UV-254” в системе хлороформ-этанол, 1:1, проявитель – пары йода. Температуры плавления определены на приборе “Voetius”.

**2-Цианциклогексилиденацетамид (1).** В литровую круглодонную колбу помещают 9.8 г (100 ммоль) циклогексанона, 8.4 г (100 ммоль) цианацетамид, 5 г (80 ммоль) уксусной кислоты, 10 мл гидроксида аммония и 100 мл бензола. Содержимое колбы кипятят с насадкой Дина-Старка до

прекращения выделения воды (~4 ч). Декантируют от уксуснокислого аммония, отгоняют растворитель, остаток тщательно промывают водой и перекристаллизовывают из абс. этанола. Выход 14.26 г (87%), т.пл. 110°C.  $R_f$  0.56. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1620 (C=C), 1659 (C=O, амид.). 2220 (C≡N). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.60-1.80 (м, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>); 2.49-2.55 (2H, м, =CCH<sub>2</sub>); 2.60-2.65 (2H, м, =CCH<sub>2</sub>); 7.30 (уш. с, 1H) и 7.40 (уш. с, 1H, NH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$ , 25.1 (CH<sub>2</sub>); 27.1 (CH<sub>2</sub>); 27.5 (CH<sub>2</sub>); 31.00 (CH<sub>2</sub>); 34.6 (CH<sub>2</sub>); 95.5 (CH<sub>2</sub>), 104.9 (=C); 115.7 (C≡N); 162.6 (=C); 167.9 (CO). Найдено, %: C 65.60; H 7.88; N 17.00. C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O. Вычислено, %: C 65.83; H 7.37; N 17.06.

**2-(1-Бензилциклогексил)-2-цианацетамид (2).** К эфирному раствору реагента Гриньяра, полученного из 2.4 г (100 ммоль) магния и 12.65 г (100 ммоль) бензилхлорида в 120 мл абсолютного эфира, при слабом кипении прибавляют по каплям раствор 16.40 г (100 ммоль) цианацетамида **1** в 120 мл абс. эфира, после чего при перемешивании нагревают в течение 2 ч при температуре 42-45°C. Реакционную смесь охлаждают ледяной водой, прибавляют по каплям 74 мл 20% серной кислоты и перемешивают при комнатной температуре до полного разложения комплекса. Органический слой отделяют, водный экстрагируют эфиром, присоединяют к основному слою, дважды промывают водой и сушат над сульфатом магния. После отгонки растворителя остаток перекристаллизовывают из абс. этанола. Выход 20.48 г (80%), т. пл. 195°C.  $R_f$  0.58. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1610 (C=C, аром.), 1750 (C=O). 2260 (C≡N). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д., Гц): 1.28-1.68 (м, 9H) и 1.76-1.86 (м, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>); 2.70 (д, J= 13.7, CH<sub>2</sub>); 3.24 (д, J= 13.7, CH<sub>2</sub>); 3.59 (с, 1H, CH); 7.15 (1H, уш.с, NH<sub>2</sub>); 7.15-7.29 (м, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7.51 (1H, уш.с, NH<sub>2</sub>). Найдено, %: C 74.60; H 7.88; N 11.00. C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O. Вычислено, %: C 74.97; H 7.86; N 10.93.

**4'-Амино-1H'-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамид (3).** В реакционную колбу помещают 25.60 г (100 ммоль) 2-(1-бензилциклогексил)-2-цианацетамида **2** и при перемешивании из капельной воронки прибавляют 52 мл концентрированной серной кислоты (при охлаждении водой поддерживают температуру реакционной смеси в интервале 25-30°C). По окончании прикапывания смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, после чего реакционную смесь выливают на 600 г льда. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают водой, затем прибавляют 60 мл воды и 30 мл водного аммиака, экстрагируют эфиром. После отгонки растворителя остаток перекристаллизовывают из смеси этанол-вода, 2:1. Выход 1.84 г (72%), т. пл. 185°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1615 (C=C, аром), 1620 (C=C), 3000-3200 (NH). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.20-1.80 (м, 10H, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>); 2.51 (2H, с, CH<sub>2</sub>); 7.32 (уш. с, 2H, CONH<sub>2</sub>); 7.16 (м, 1H); 7.22-7.28 (м, 1H); 7.22-7.28 (м, 1H).

Найдено, %: С 74.68; Н 7.80; N 10.86.  $C_{16}H_{20}N_2O$ . Вычислено, %: С 74.97; Н 7.86; N 10.93.

**2-Алкил(арил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-оны (4а-ф) (общая методика).** Смесь 2.56 г (10 ммоль) соединения **3** и 10 ммоль соответствующего хлорангидрида в 30 мл абс. бензола кипятят с обратным холодильником 4 ч. После отгонки растворителя остаток перекристаллизовывают из этанола.

**2-Метил-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (4а).** Выход 2.29 г (82%), т. пл. 195°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1560 (C=C аром); 1639 (C=C); 1750 (C=O амид); 3220 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.33-2.72 (с, 10H,  $C_6H_{10}$ ); 2.37 (с, 3H,  $CH_3$ ); 3.12 (с,  $CH_2$ ); 7.10-7.21 (м, 1H); 7.23-7.30 (м, 2H); 7.39-7.50 (м, 3H) и 8.16-8.22 (м, 3H, H-Ар.); 12.40 (ш.с, NH). Найдено, %: С 77.30; Н 7.26; N 10.00.  $C_{16}H_{20}N_2O$ . Вычислено, %: С 77.11; Н 7.19; N 9.99.

**2-Этил-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (4б).** Выход 2.35 г (80%), т. пл. 210°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1540 (C=C, аром), 1640 (C=C); 1760 (C=O амид); 3230 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.21 (м, 3H,  $CH_3$ ); 1.33-1.45 (м, 3H); 1.52-1.65 (м, 4H); 2.69 (м, 2H,  $CH_2CH_3$ ); 3.21 (с,  $CH_2$ ); 1.71-1.80 (м, 1H) и 2.60-2.72 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 3.12 (с,  $CH_2$ ); 7.15-7.19 (м, 1H); 7.25-7.33 (м, 2H); 7.44-7.53 (м, 3H) и 8.19-8.13 (м, 3H, H-Ар.); 12.40 (ш.с, NH). Найдено, %: С 77.60; Н 7.48; N 10.00.  $C_{19}H_{22}N_2O$ . Вычислено, %: С 77.52; Н 7.53; N 9.52.

**2-Пропил-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (4с).** Выход 2.15 г (70%), т. пл. 235°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1530 (C=C, аром); 1630 (C=C); 1750 (C=O амид); 3220 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 0.90 (м, 3H,  $CH_3$ ); 1.33-1.35 (м, 3H); 1.44 (м, 2H,  $CH_2CH_2CH_3$ ); 1.52-1.65 (м, 4H); 1.53 (м, 2H,  $CH_2CH_2CH_3$ ); 3.11 (с,  $CH_2$ ); 1.71-1.80 (м, 1H) и 2.60-2.72 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 7.15-7.19 (м, 1H); 7.25-7.33 (м, 2H); 7.44-7.53 (м, 3H) и 8.19-8.131 (м, 3H, H-Ар.); 12.44 (ш.с, NH). Найдено, %: С 77.60; Н 7.88; N 8.98.  $C_{20}H_{24}N_2O$ . Вычислено, %: С 77.89; Н 7.84; N 9.08.

**2-Фенил-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (4д).** Выход 2.56 г (75%), т. пл. 275-277°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1540 (C=C аром); 1610 (C=C); 1750 (C=O амид), 3230 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.33-1.45 (м, 3H); 1.52-1.65 (м, 4H); 1.71-1.80 (м, 1H) и 2.60-2.72 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 3.02 (с,  $CH_2$ ); 7.15-7.19 (м, 1H); 7.25-7.33 (м, 2H); 7.44-7.53 (м, 3H) и 8.19-8.31 (м, 3H, H-Ар.); 12.42 (ш.с, NH). Найдено, %: С 74.60; Н 7.88; N 11.00.  $C_{23}H_{22}N_2O$ . Вычислено, %: С 80.67; Н 6.48; N 8.18.

**2-Бензил-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (4е).** Выход 2.84 г (80%), т. пл. 270°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1530 (C=C аром); 1620 (C=C); 1760 (C=O амид); 3220 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.33-1.45 (м, 3H); 1.52-1.65 (м, 4H); 1.71-1.80 (м, 1H) и 2.60-2.72 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 3.02 (с,  $CH_2$ ); 3.58 (с,  $CH_2C_6H_5$ ); 7.15-7.19 (м, 1H); 7.25-7.33 (м, 2H); 7.44-7.53 (м, 3H) и 8.19-8.31 (м, 3H, H-Ар.); 12.42 (ш.с, NH). Найдено,

%, С 80.69; Н 7.00; N 7.70.  $C_{24}H_{24}N_2O$ . Вычислено, %: С 80.87; Н 6.97; N 7.86.

**2-(Хлорметил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (4f).** Выход 2.51 г (70%), т. пл. 260°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1520 (C=C аром); 1610 (C=C); 1750 (C=O амид); 3230 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.,  $\Gamma$ ц: 1.26-1.43 (м, 3H); 1.48-1.65 (м, 4H); 1.68-1.78 (м, 1H) и 2.52-2.64 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 2.99 (с, 2H,  $CH_2$ ); 4.40 (с, 2H,  $CH_2$  Cl), 7.12-7.17 (м, 1H); 7.21-7.31 (м, 2H) и 8.06 (дд,  $J=6.9$ ,  $J=2.1$ , 1H,  $C_6H_4$ ); 12.47 (1H, ш.с, NH). Найдено, %: С 68.60; Н 6.28; N 9.00.  $C_{18}H_{19}ClN_2O$ . Вычислено, %: С 68.67; Н 6.08; N 8.90.

**2-Аминометилзамещенные-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-оны (5a-f).** Смесь 3.14 г (10 ммоль) 2-(хлорметил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-она (9), 50 мл абсолютного этанола и 80 ммоль соответствующего амина слабо нагревают в течение 5 мин и оставляют при комнатной температуре на 48 ч. Смесь разбавляют 100 мл воды, выпавший осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из абс. этанола.

**2-(Диэтиламино)метил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (5a).** Выход 2.28 г (65%), т. пл. 170°C.  $R_f$  0.60. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1585 (C=C аром); 1620 (C=N); 1636 (C=C-C=O); 3140 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.,  $\Gamma$ ц: 1.02 [т, 6H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ,  $J=7.1$ ]; 1.26-1.42 (м, 3H); 1.48-1.78 (м, 5H) и 2.51-2.64 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 2.69 (к, 4H,  $N(CH_2)_2$ ,  $J=7.1$ ); 2.98 (с, 2H,  $NCH_2$ ); 7.14-7.18 (м, 1H); 7.21-7.31 (м, 2H) и 8.06 (дд, 1H,  $J=6.9$ ,  $J=2.1$ , 1H,  $C_6H_4$ ); 12.42 (1H, ш.с, NH). Найдено, %: С 75.20; Н 8.28; N 11.70.  $C_{22}H_{29}N_3O$ . Вычислено, %: С 75.18; Н 8.32; N 11.96.

**2-(Фениламино)метил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (5b).** Выход 3.15 г (85%), т. пл. 265°C.  $R_f$  0.65. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1580 (C=C аром); 1610 (C=N); 1640 (C=C-C=O); 3160 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.33-1.42 (м, 3H); 1.43-1.64 (м, 4H); 1.72-1.80 (м, 1H) и 2.62-2.74 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 3.08 (с, 2H,  $CH_2$ ); 3.38 (с, 2H,  $NHCH_2$ ); 4.00 (с, 1H, NH); 7.18-7.19 (м, 1H); 7.24-7.33 (м, 2H); 7.43-7.53 (м, 3H) и 8.20-8.32 (м, 3H, H-Ar.); 12.47 (1H, ш.с, NH). Найдено, %: С 77.20; Н 6.28; N 11.50.  $C_{24}H_{25}N_3O$ . Вычислено, %: С 77.60; Н 6.78; N 11.31.

**2-((4-Хлорфениламино)метил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (5c).** Выход 3.24 г (80%), т. пл. 260°C.  $R_f$  0.60. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1570 (C=C аром); 1620 (C=N); 1630 (C=C-C=O); 3180 (NH). Спектр ЯМР  $^1H$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.23-1.33 (м, 3H); 1.49-1.63 (м, 3H); 1.70-1.82 (м, 1H) и 2.55-2.70 (м, 2H,  $C_6H_{10}$ ); 3.06 (с, 2H,  $CH_2$ ); 3.38 (с, 2H,  $NHCH_2$ ); 4.00 (с, 1H, NH); 7.24-7.30 (м, 2H); 7.44-7.54 (м, 3H) и 8.20-8.31 (м, 3H, H-Ar.); 12.42 (1H, ш.с, NH). Найдено, %: С 71.20; Н 6.00; Cl 8.56; N 10.50.  $C_{24}H_{24}ClN_3O$ . Вычислено, %: С 71.01; Н 5.96; Cl 8.73; N 10.35.

**2-((2,5-Дихлорфениламино)метил)-3Н-спиро[бензо[*h*]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6Н)-он (5d).** Выход 3.07 г (70%), т. пл. 270°C.  $R_f$  0.68. ИК-спектр,  $\nu$ ,  
528

$\text{см}^{-1}$ : 1560 (C=C аром), 1610 (C=N); 1620 (C=C-C=O); 3190 (NH). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.33 -1.44 (м, 3H); 1.50-1.63 (м, 4H); 1.70-1.79 (м, 1H) и 2.58-2.70 (м, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_{10}$ ); 3.02 (с, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3.38 (с, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ); 4.00 (с, 1H, NH); 7.15-7.18 (м, 1H); 7.15-7.18 (м, 1H); 7.25-7.30 (м, 2H) и 8.19-8.30 (м, 2H, H-Ar.); 12.47 (1H, ш.с, NH). Найдено, %: C 65.20; H 5.40; Cl 16.40; N 10.00.  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено, %: C 65.46; H 5.26; Cl 16.10; N 9.54.

**2-((Циклогексиламино)метил)-3H-спиро[бензо[h]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6H)-он (5e).** Выход 2.19 г (67%), т. пл. 185°C.  $R_f$  0.60. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1550 (C=C аром); 1620 (C=N); 1610 (C=C-C=O); 3180 (NH). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$ , м. д.,  $\text{Гц}$ : 1.11-1.21 (м, 4H); 1.26-1.65 (м, 7H); 1.35-1.60 (м, 4H); 1.47-1.49 (м, 2H); 2.57 (м, 1H, CH); 2.00 (с, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ); 2.98(с, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3.02 (с, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7.18-7.31 (м, 3H) и 8.08 (дд, 1H,  $J=6.9$ ,  $J=2.1$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ); 12.42 (1H, ш.с, NH). Найдено, %: C 76.20; H 8.40; N 11.50.  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено, %: C 76.35; H 8.28; N 11.13.

**2-(Морфолинометил)-3H-спиро[бензо[h]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6H)-он (5f).** Выход 1.47 г (67%), т. пл. 250°C.  $R_f$  0.68. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1540 (C=C, аром), 1610 (C=N); 1620 (C=C-C=O); 3160 (NH). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$ , м. д.,  $\text{Гц}$ : 1.32-1.46 (м, 3H); 1.52-1.80 (м, 5H) и 2.62-2.74 (м, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_{10}$ ); 2.99(с, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.59 [(т, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ ,  $J=4.7$ ]; 3.43 (с, 2H,  $\text{NCH}_2$ ); 3.65[(т, 4H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2$ ,  $J=4$ ]; 7.24-7.44 (м, 3H) и 8.08 (дд, 1H,  $J=6.9$ ,  $J=2.1$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ); 12.47 (1H, ш.с, NH).  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$ . Найдено, %: C 72.20; H 7.64; N 11.64.  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено, %: C 72.30; H 7.45; N 11.50.

**3H-Спиро[бензо[h]хиназолин-5,1'-циклогексан]-4(6H)-он (6).** Смесь 2.56 г (10 ммоль) соединения **3** и 30 мл формамида кипятят с обратным холодильником 6 ч. После охлаждения образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, промывают водой, этанолом и перекристаллизовывают из ДМФА. Выход 2.00 г (77%), т. пл. 190°C.  $R_f$  0.55. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1580 (C=C, аром); 1650 (C=O); 3170 (NH). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$ , м. д.,  $\text{Гц}$ : 1.47-1.49 (м, 2H); 1.43-1.53 (м, 4H) и 1.53-1.78 (м, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_{10}$ ); 3.02 (с, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7.24-7.44 (м, 3H) и 8.00 (дд, 1H,  $J=6.9$ ,  $J=2.1$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ); 8.08 (1H, с, NH); 12.42 (1H, с, CH).  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ . Найдено, %: C 76.40; H 6.44; N 10.74.  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ . Вычислено, %: C 76.66; H 6.81; N 10.52.

**4'-(3-Бензоилтиоуреидо)-1'H-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамид (7).** Смесь 2.56 г (10 ммоль) соединения **3** и 1.63 г (10 ммоль) бензоилизотиоцианата в 50 мл абс. этанола кипятят с обратным холодильником 18 ч. После охлаждения образовавшиеся кристаллы отфильтровывают и перекристаллизовывают из смеси этанол-вода, 2:1. Выход 3.22 г (77%), т. пл. 195°C.  $R_f$  0.55. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1580 (C=C, аром); 1650 (C=O); 3170 (NH). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$ , м. д.,  $\text{Гц}$ : 1.43-1.53 (м, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_{10}$ ); 1.70-1.78 (м, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_{10}$ ); 2.80 (2H, уш. с,  $\text{CH}_2$ ); 7.33 (д, 1H,  $J=7.8$ ,  $\text{C}_6\text{H}_2$ ); 7.63 (д, 1H,  $J=7.8$ ,  $\text{C}_6\text{H}_2$ ); 7.70-8.03 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ); 13.43 (уш.

с, 1H, NH). Найдено, %: С 68.58; Н 6.18; N 10.24; S 7.44.  $C_{24}H_{25}N_3O_2S$ . Вычислено, %: С 68.71; Н 6.01; N 10.02; S 7.64.

**1'Н-Спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-4'(3'Н)-он (8).** Смесь 9.01 г (20 ммоль) 4'-(3-бензоилтиоуреидо)-1'Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамиды (3), 2.24 г (40 ммоль) гидроксида калия в 30 мл воды и 30 мл этанола кипятят с обратным холодильником 6 ч, после чего добавляют воду, выпавшие кристаллы перекристаллизовывают из этанола. Выход 2.73 г (64%), т. пл. 65°C. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1605 (C=C аром); 1675 (C=O). Спектр ЯМР  $^1H$  ( $\Delta MCO-d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 1.35-1.57 (м, 10H,  $C_6H_{10}$ ); 2.47 (уш. с, 2H,  $CH_2$ ); 2.73 (уш. с, 2H,  $CH_2$ ); 7.20-7.25 (м, 2H); 7.40-7.44 (м, 1H); 7.81-7.83 (м, 1H). ЯМР  $^{13}C$  спектр, 19.2 ( $CH_3$ ); 21.0 ( $2 \cdot CH_2$ ); 22.4 ( $CH_3$ ); 25.6 ( $CH_2$ ); 34.5, 36.0 ( $2 \cdot CH_2$ ); 38.7 ( $CH_2$ ); 50.5 ( $CH_2$ ), 129.0 (=CH); 130.2, 133.2 (=CH); 133.3, 137.0, 140.2, 198.3 (CO). Найдено, %: С 84.20; Н 8.64.  $C_{15}H_{18}O$ . Вычислено, %: С 84.07; Н 8.47.

#### **4'-ԱՄԻՆՈ-1'ԻՆ-ՍՊԻՐՈ[ՅԻԿԼՈՏՈՔՍԱՆ-1,2'-ՆԱՓԹԱԼԵՆ]-3'-ԿԱՐԲՈՔՍԱՄԻԴԻ ՍԻՆԹԵԶԸ, ՓՈԽԱՐԿՈՒՄՆԵՐԸ և ՍՏԱՅՎԱԾ ՄԻԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ ՆԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ**

**Ն. Պ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Ա. Ս ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Ռ. Գ. ՊԱՐՈՆԻԿՅԱՆ և Ռ. Ս. ՍՈՒԿԱՅԱՆ**

Ցիկլոհեքսանոնի և ցիանամիդի փոխազդեցությունից ստացվել է 2-ցիան-2-ցիկլոհեքսիլիդենացետամիդ, որը, հետագայում փոխազդելով բենզիլմագնեզիումքլորիդի հետ, առաջացրել է 2-(1-բենզիլցիկլոհեքսիլ)-2-ցիանացետամիդ: Ցույց է տրվել, որ վերջինիս խիտ ծծմբական թթվի ազդեցությամբ բերել է 4'-ամինո-1'ԻՆ-սպիրո[ցիկլոհեքսան-1,2'-նափթալեն]-3'-կարբոքսամիդի, որը ռեակցիվելով մի շարք կարբոնաթթուների քլորանհիդրիդների հետ առաջացրել է համապատասխան բենզոլ[ի]խինազոլիններ: 4'-(3-բենզոլիլթիոուրեիդ)-1'ԻՆ-սպիրո[ցիկլոհեքսան-1,2'-նափթալեն]-3'-կարբոքսամիդի հիմնային հիդրոլիզը բերել է 1'ԻՆ-սպիրո[ցիկլոհեքսան-1,2'-նափթալեն]-4'(3'ԻՆ)-ոնի: Ուսումնասիրվել են սինթեզված միացությունների կենսաբանական հատկությունները:

#### **THE SYNTHESIS AND TRANSFORMATIONS OF 4'-AMINO-1'H-SPIRO[CYCLOHEXANE-1,2'-NAPHTALENE]-3'-CARBOXAMIDES, STUDY OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE SYNTHESIZED COMPOUNDS**

**N. P. GRIGORYAN, A. S. GRIGORYAN, R. G. PARONIKYAN and R. S. SUKASYAN**

The Scientific Technological Centre of Organic and  
Pharmaceutical Chemistry NAS RA  
A.L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry  
26, Azatutyan Str., Yerevan, 0014, Armenia  
E-mail: never-55@mail.ru

Cyanacetamide reacting with cyclohexanone gives 2-cyano-2-cyclohexylideneacetamide- reacting further with benzylmagnesium chloride to form 2-(1-

benzylcyclohexyl)-2-cyanacetamide in high yield. It is found that the latter under the action of sulfuric acid is cyclized to 4'-amino-1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-naphthalene]-3'-carboxamide, which reacts with chlorides of a large number of carboxylic acids to form the corresponding spirobenzo[h]quinazolines. Alkaline hydrolysis 4'-(3-benzoylthioureido)-1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-naphthalene]-3'-carboxamide, afforded 1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-naphthalen]-4'(3'H)-one. Anticonvulsive and antidepressant activities of the synthesized compounds are studied.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Duch D.S. Dev, IK Banks* // *Cancer Res.*, 1993, v. 53, №4, p. 810.
- [2] *Hanlon M., Ferone R.* // *Cancer Res.*, 1996, v. 56, №14, p. 3301.
- [3] *Gmeiner W.H.* // *Current Med. Chemistry*, 2005, v. 12, p. 191.
- [4] *Bruno O., Schenone S., Ranise A.* // *Pharmacology*, 1999, v. 54, p. 95.
- [5] *Takaji K., Hideki H., Hirota T., Ohmori Sh., Ramato M.* // *Chem. Pharm. Bull.*, 1975, №23, p. 2015 // *Chem. Abstr.*, 1976, 84, 5232 w.
- [6] *Григорян Н.П., Тарзян Л. А., Маркосян А.И.* // *Хим. ж. Армении*, 2009, т. 62, №1-2, с.160.
- [7] *Григорян Н.П., Тарзян Л.А., Маркосян А.И.* // *Хим.-фарм. ж.*, 2011, т. 45. №2, с.17.
- [8] *Маркосян А.И., Оганисян М.Г., Куроян Р.А.* // *ХГС*, 1992, №5, с. 658.
- [9] *Сафразбекян Р.Р., Сукасян Р.С.* // *Вопросы мед. химии*, 1970, №16, с. 623.
- [10] *Беленький М.Л.* *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. Л., Наука, 1963, с. 81.

## **ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ**

УДК 577.19:602.4

### **ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ**

**А. Е. АГАДЖАНЫН, Г. Ж. ОГАНИСЯН, К. И. ЕГИЯН и А. С. САГИЯН**

Научно-производственный центр "Армбиотехнология"

НАН Республики Армения

Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14

E-mail: armbiotech@gmail.com

Поступило 15 VII 2015

Исследованы процессы выделения и очистки различных классов БАВ из ФР, выявлены закономерности этих процессов, разработаны технологические параметры процессов и созданы эффективные технологии их выделения и очистки из ФР.

Разработан бессорбционный процесс выделения L-валина из ФР. Определены оптимальные технологические параметры кристаллизации технических кристаллов валина из раствора соляной кислоты и электромембранного способа перевода валина из гидрохлоридной формы в цвиттерионную.

Исследован процесс трансформации цитрата натрия в лимонную кислоту из пермеата ФР методом электродиализа и показано, что технологически предпочтительно проводить трансформацию до 90-95%, а трансформацию остаточного цитрата после электродиализа и обессоливания раствора осуществлять с помощью ионного обмена.

Исследован процесс выделения микробного меланина из нативного раствора с использованием ионообменных смол и определены оптимальные технологические параметры процесса сорбции и элюции.

Изучены физико-химические свойства выделенного микробного меланина и выявлен ряд структурных особенностей.

Разработана эффективная технология выделения и очистки биоингибирующего вещества из КЖ, которая позволяет получить очищенный от сопутствующих примесей продукт, имеющий сильное биоингибирующее действие на патогенные микроорганизмы.

Рис. 5, табл.1, библиографические ссылки 47.

Особое место в биотехнологическом производстве биологически активных веществ (БАВ) занимает выделение и очистка целевого продукта из ферментационных растворов (ФР).

В процессе выделения и очистки БАВ из ФР часто приходится использовать сложные и, как правило, нестандартные индивидуальные технологические подходы, позволяющие получить целевые продукты высокой степени чистоты.

Одной из наиболее трудоемких стадий при выделении БАВ, в частности аминокислот из ФР, является обессоливание центрифугатов или пермеатов сорбционным методом. На этой стадии образуется значительное количество сорбционных и регенерационных стоков и расходуются большие объемы аммиачных растворов, которые приходится утилизировать.

Согласно оценкам экономистов, себестоимость БАВ примерно на 60% определяется затратами на стадиях выделения и очистки из ФР, поэтому разработка эффективных методов выделения и очистки БАВ, представляющих коммерческий интерес, является актуальной задачей [1].

Целью предлагаемой работы являлось исследование процессов выделения и очистки различных классов БАВ (аминокислоты, оксикислоты, микробного меланина и биоингибирующего продукта) из ФР и разработка эффективных технологий выделения и очистки вышеуказанных классов БАВ из ФР микробного синтеза.

### **Выделение и очистка L-валина из ФР**

ФР валина, помимо целевого продукта, содержит также сопутствующие аминокислоты, окрашенные компоненты, минеральные соли и т.д. [2]. Если очистка валина от окрашенных компонентов, минеральных солей и некоторых сопутствующих аминокислот не представляет сложности, то очистка от лейцина, который по физико-химическим показателям схож с валином, связана с большими трудностями. В патентной литературе известен способ выделения и очистки валина из ФР [3]. Суть способа заключается в отделении биомассы центрифугированием, подкисление фугата до pH 1.5-2.0 и сорбцией валина на катионите КУ-2×8 в  $H^+$ -форме и его элюции из фазы смолы аммиачной водой. Далее элюат подвергают вакуум-выпариванию, обесцвечиванию, концентрированию и выделяют технические кристаллы L-валина. Перекристаллизация технических кристаллов в горячей соляной кислоте позволяет получить целевой продукт с содержанием основного вещества 99.2-99.4%. Недостатком способа является многостадийность, что приводит к низкому выходу целевого продукта на стадии выделения и очистки. Так, нап-

пример, применение ионообменного метода извлечения валина из фугата приводит к тому, что в технологии используются несколько трудоемких стадий (сорбция, десорбция, отгонка аммиака, утилизация сорбционных и регенерационных стоков и т.д.) Существенным недостатком метода является и то, что неправильно выбраны технологические параметры солянокислой перекристаллизации и его трансформации из солевой формы в цвиттерионную.

Для выделения валина из ФР в работе [4] предлагается использовать экстракционный метод с использованием жидкого сульфокатионита (раствор динилнафталинсульфокислоты в гептане).

Возможность использования жидких сульфокатионитов для выделения аминокислот из водных сред приведена также в работе [5]. Необходимо отметить, что работы по извлечению валина из пермеатов ФР с использованием жидкого сульфокатионита, как проведенные нами, так и другими авторами работ [6], показали невозможность отделения валина от сопутствующих аминокислот (лейцин, аланин) на стадии экстракции. Если принять во внимание, что при использовании жидких катионитов возникает необходимость регенерации органического растворителя и для рекстракции аминокислот с катионита приходится использовать водный раствор аммиака высокой концентрации (8-10%) то предложенный метод по некоторым показателям уступает способу, указанному в работе [3].

## **Экспериментальная часть**

Эксперименты по растворимости L-валина и L-лейцина в растворе соляной кислоты проводили выдерживанием в термостате с периодическим отбором жидкой фазы для анализа на содержание аминокислоты. К 100 мл раствора соляной кислоты соответствующей концентрации добавлялось такое количество кристаллов L-валина и L-лейцина, чтобы после установления равновесия оставались нерастворенные кристаллы (~0.5 г), которые от раствора отделяли фильтрацией. Во избежание кристаллообразования при фильтрации воронку и приемник термостатировали.

Содержание аминокислот в растворе определяли с помощью аминокислотного анализатора "ААА-881" (ЧССР) и спектрофотометрически.

Изогидрическую кристаллизацию технических кристаллов валина в растворе соляной кислоты проводили при изменении температуры раствора путем отбора проб с температурным интервалом 5°C.

Эксперименты по трансформации гидрохлорида валина в цвиттерионную форму и обессоливание раствора проводили в прямоточном циркуляционном четырехкамерном аппарате с межмембранным

расстоянием 3 мм. Камеры электродиализатора были разделены катионообменными мембранами МК-40 (Россия).

Пермеаты L-валина и L-изолейцина получали осаждением клеточно-го материала ФР безмельной ферментации центрифугированием в течение 20 мин при 4200 g, после чего полученные супернатанты подвергали ультрафильтрации с использованием аппарата периодического действия с полыми волокнами AP-02 (Россия). Из полученных пермеатов технические кристаллы валина и изолейцина выделяли вакуум-выпариванием до соответствующего значения сухих веществ (СВ) в растворе и водной кристаллизацией.

## Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что из фугатов или пермеатов ФР мало- (L-лейцин) и среднерастворимые (L-валин) нейтральные аминокислоты можно выделять в форме технических кристаллов. Ввиду того, что кристаллы валина и лейцина имеют пластинчатую форму и обладают большой поверхностной активностью, то с помощью кристаллизации в водной среде невозможно осуществлять их разделение [2,3].

Авторами работ [3,7] показано, что если кристаллизацию валина осуществлять в солянокислой среде, то за счет изменения формы кристаллов отделение валина от лейцина и других сопутствующих аминокислот становится возможным.

В работе [8] изучен процесс выделения и очистки валина из ФР и определены некоторые параметры процесса.

В солянокислой среде осуществлено также разделение гидрохлорида D,L-валина на оптические изомеры [9].

В вышеприведенных работах недостаточно отражены технологические параметры процесса кристаллизации (температура, время, концентрация соляной кислоты, соотношение твердой и жидкой фаз, условия перевода гидрохлорида аминокислот в цвиттерионную форму и т.д.) нейтральных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин и т.), кристаллы которых имеют пластинчатую форму.

Изучение растворимости L-валина и L-лейцина в соляной кислоте показало, что при перекристаллизации технических кристаллов валина оптимальная концентрация кислоты, необходимая для отделения валина от лейцина составляет 12.5-17.5%. Установлено, что высокий выход валина на стадии перекристаллизации получается при соотношении твердой фазы к жидкой, равном 1.2-1.35. При этом одному молю валина соответствует 1.6-1.9 грамм-иона хлора [10].

Изучение влияния температуры на концентрацию гидрохлорида валина в растворе в ходе изогидрической кристаллизации показало, что формирование и рост кристаллов целесообразно осуществлять при тем-

пературе массовой кристаллизации (49-40°C) с выдерживанием раствора в изотермических условиях в течение периода кристаллообразования [8].

После завершения кристаллизации отфильтрованные и отжатые на фильтре кристаллы гидрохлорида валина промывали охлажденным до 10°C 17% раствором соляной кислоты.

Исследования показали, что перевод валина из гидрохлоридной формы в цвиттерионную предпочтительно осуществлять с помощью электромембранного метода [10].

Установлено, что процесс трансформации эффективно протекает в четырехкамерном аппарате, имеющем следующую последовательность ионообменных мембран (рис 1).

Использование электромембранного способа трансформации позволяет одновременно регенерировать связанную с валином основную часть соляной кислоты, которую можно использовать на стадии солянокислой кристаллизации или в других технологических циклах.

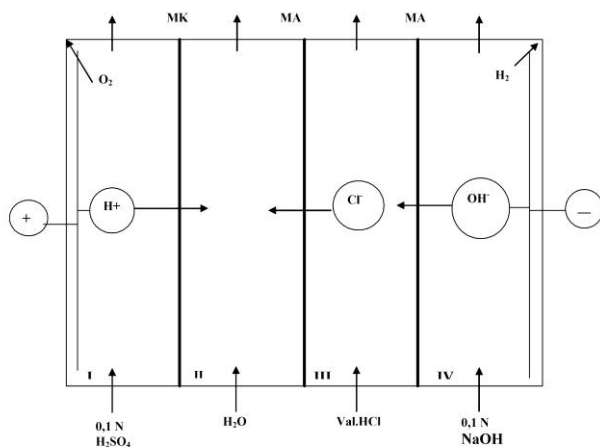


Рис. 1. Схема расположения мембран и поток растворов в четырехкамерном электродиализаторе. МА и МК- соответственно МА-40 и МК-40 типы мембран.

Установлено, что процесс трансформации эффективно протекает при предельной плотности тока ( $i = 43 \text{ mA/cm}^2$ ) и концентрации гидрохлорида валина в исходном растворе, равной 0.5 М. Процесс трансформации протекает без потери валина.

После электродиализа раствор валина упаривали до содержания СВ=48-50% и с помощью водной кристаллизации в двухступенчатом цикле выделяли кристаллы L-валина. Полученные кристаллы объединяли и водной перекристаллизацией, включающей растворение кристаллов, обесцвечивание, ультрафильтрацию, упаривание в вакууме, кристаллизацию и сушку, получали чистые кристаллы L-валина.

Ввиду того, что солянокислотная перекристаллизация используется также при разделении фенилаланина от тирозина [11,12] и лейцина от

изолейцина, полученные закономерности по кристаллизации и трансформации аминокислоты из гидрохлоридной формы в цвиттерионную, по-видимому, можно применять и в технологии получения этих аминокислот.

## **Выделение и очистка лимонной кислоты из ФР**

Лимонная кислота и ее соли относятся к числу наиболее важных продуктов, производимых биотехнологическим способом в широких масштабах. Традиционный способ выделения лимонной кислоты из ФР включает отделение биомассы и ее осаждение из нативного раствора известковым молоком с последующим растворением цитрата кальция серной кислотой. Далее выделение лимонной кислоты из фильтрата осуществляется путем обесцвечивания, обессоливания, выпарки, кристаллизации и сушки [13]. При этом в производстве образуется большое количество жидких стоков и твердых отходов, в результате чего технология становится громоздкой и трудоемкой.

Известны способы выделения лимонной кислоты из нативного раствора экстракцией органическими растворителями, содержащими третичный амин [14], или октаном, содержащим тирдодецилуриламмин [15]. При этом необходимо использование высокоочищенных растворителей, что делает способ сложным в реализации и дорогим.

В последнее время значительное внимание уделялось сорбционному способу выделения как лимонной кислоты, так и цитратов [16,17]. Недостатком способа является использование большого объема смолы, что приводит к расходу большого количества кислоты, основания и деминерализованной воды для регенерации смол и образованию значительных объемов регенерационных и сорбционных стоков.

В работах [18,19] описан электродиализный метод получения лимонной кислоты из ее натриевой соли из модельного раствора.

Основным недостатком электродиализного способа получения лимонной кислоты является то, что при этом нативный раствор очищается лишь от катионов.

## **Экспериментальная часть**

КЖ лимонной кислоты получена культивированием штамма-продуцента *Yarrowia Lipolytica* ВКМ У-2820 Д в питательной среде. В конце ферментации лимонная кислота в КЖ накапливается в форме цитрата натрия.

Электромембранную трансформацию цитрата натрия в лимонную кислоту проводили в электродиализаторе с межмембранным расстоя-

нием 3 мм. В анодной камере циркулировал 0.1 н раствор  $H_2SO_4$ , а в катодной — 0.1 н раствор NaOH.

Концентрация цитрата натрия в растворе составляла 74 г/л. Величина предельной плотности тока в исследуемой системе составляла 26.4 мА/см<sup>2</sup> [20].

Концентрации лимонной кислоты и ее солей определяли переводом их в пентабромацетон и экстракцией хлороформом с последующим определением оптической плотности экстракта при длине волны 245 нм.

Обессоливание и обесцвечивание раствора лимонной кислоты после электродиализа осуществляли пропусканием раствора по направлению снизу вверх через три последовательно соединенные ионообменные колонки, заполненные сульфокатионитом КУ-2×8 в  $H^+$ -форме, анионитом ЭДЭ-10 П в цитратной форме и ионсорбентом ИА-1р в  $Cl^-$ -форме. Количество смолы, загружаемой в каждую колонку, определяли исходя из общего количества катионов, анионов и окрашенных компонентов в цитратном растворе [21].

## Результаты и их обсуждение

Экспериментальные результаты по трансформации цитрата в лимонную кислоту в зависимости от продолжительности опыта приведены на рис. 2.

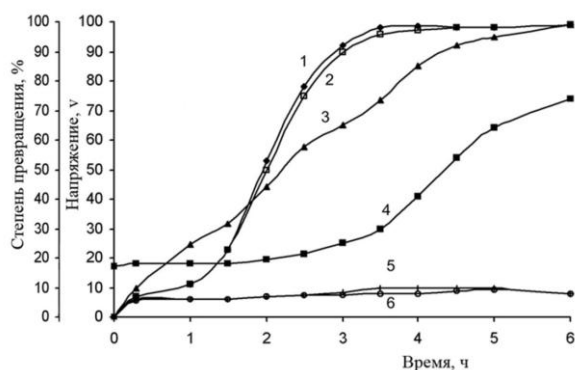


Рис. 2. Кинетика трансформации цитрата в лимонную кислоту в двух- (1), трех- (2) и четырехкамерном (3) электродиализаторе: 4,5,6 — изменение напряжения в цепи четырех-, трех- и двухкамерных электродиализаторов, соответственно.

Как видно из рис. 1, трансформация эквимольной смеси одно- и двузамещенных солей цитрата натрия в лимонную кислоту в двух- и трехкамерных электродиализаторах в зависимости от времени имеет вид S-образной кривой.

Из данных, полученных в двух- и трехкамерных электродиализаторах, следует, что если трансформация цитрата, равная 90%, протекает в течение 2.7-3.0 ч, то для увеличения этого показателя до 98-99.0% необходимо продлить опыт еще на 3.0 ч.

Из рис. 1 видно, что трансформация цитрата в кислоту в двух- и трехкамерных электродиализаторах протекает быстрее, чем в четырех-

камерном. Процесс трансформации цитрата в лимонную кислоту в двух- и трехкамерных электродиализаторах протекает со значительно меньшим расходом энергии (рис.1, кр. 5,6), чем в четырехкамерном (рис. 1, кр. 4). Если учитывать, что в процессе электродиализа в анодной камере двухкамерного электродиализатора происходит частичное (~5-7%) окисление лимонной кислоты с образованием  $\alpha$ -кетоглutarовой кислоты, то процесс трансформации предпочтительно проводить в трехкамерном электродиализаторе. Так как полная трансформация цитрата в лимонную кислоту приводит к большому расходу энергии и при этом не удается освободиться от неорганических анионов, трансформацию цитрата путем электродиализа проводили до уровня 85-90%, а полную трансформацию цитрата из раствора после электродиализа и его очистки от анионов осуществляли с помощью ионного обмена [22].

Ионообменную деминерализацию раствора лимонной кислоты проводили путем пропускания его через две последовательно соединенные колонки, заполненные катионитом КУ-2×8 в  $H^+$ -форме, и анионитом ЭДЭ-10П в цитратной форме. При этом происходит как полная трансформация цитрата в лимонную кислоту, так и обессоливание раствора. Результаты сорбции приведены на рис. 3.

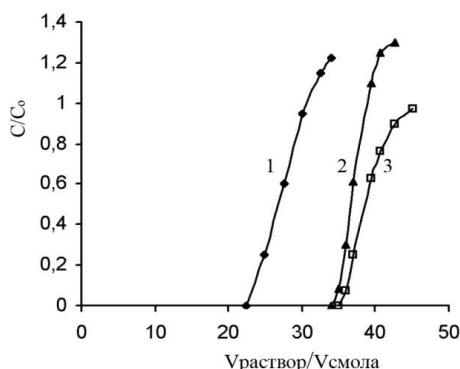


Рис. 3. Выходные кривые сорбции ионов  $Na^+$  (1),  $Cl^-$  (2) и  $SO_4^{2-}$  (3) при обессоливании раствора лимонной кислоты после электродиализа:  $C_0$  — концентрация ионов в растворе, поступающем в колонку;  $C$  — концентрация ионов в растворе, выходящем из колонки.

Исследования показали (рис. 3), что для полной трансформации цитрата через один объем катионита можно пропускать до 22 объемов раствора лимонной кислоты. Для освобождения от сопутствующих неорганических анионов через один объем анионита можно пропускать до 34 объемов раствора. Далее для очистки раствора от остаточных окрашенных пигментов и взвесей собранный обессоленный раствор лимонной кислоты подвергали обесцвечиванию с помощью активированного угля, после чего обессоленный и обесцвеченный раствор подвергали вакуум-упариванию до содержания сухих веществ (СВ) 72-74% и выделяли кристаллы лимонной кислоты изогидрической кристаллизацией.

Разработанный способ можно использовать также на стадии выделения других пищевых оксикислот (молочной, яблочной) из ФР.

Преимущество предложенного способа трансформации и обессоливания раствора лимонной кислоты заключается в том, что на стадии выделения в результате комбинирования электродиализного и сорбционного методов значительно уменьшается количество используемых ионов (до 12 раз по сравнению только с сорбционным методом) и химикатов, а также снижаются энергозатраты (до 2 раз по сравнению с электродиализным способом). Кроме того, в несколько раз снижается объем образующихся в производстве сорбционных и регенерационных стоков.

При биосинтезе лимонной кислоты с использованием вышеуказанного штамма-продуцента в ферментационном растворе накапливается также изолимонная кислота до ~10% от общего количества лимонной кислоты. Так как изолимонная кислота не кристаллизуется, она в основном накапливается в маточнике, из которого ее можно выделять в форме монокалийевой соли [16,22]. Выделение соли изолимонной кислоты значительно снижает себестоимость лимонной кислоты, т.к. изолимонная кислота примерно в 15-20 раз дороже лимонной.

### **Выделение и очистка микробного меланина из ФР и изучение его физико-химических свойств**

Меланины — темноокрашенные высокомолекулярные нерегулярные полимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых полифенолов [23,24]. Они обладают радиопротекторными и антиоксидантными свойствами, являются сорбентом радионуклидов и тяжелых металлов и способны эффективно защищать живые организмы от ультрафиолетового излучения. Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и других областях [25].

Для получения меланинов используют следующие технологии: химический синтез, предусматривающий окисление тирозина и его производных [26], экстракция из животного материала и растительного сырья [27,28], микробный синтез [29,30].

Вследствие большого химического разнообразия биологических материалов, являющихся сырьем для получения меланина, единого стандартного метода выделения и очистки не существует [31].

### **Экспериментальная часть**

ФР меланина был получен при культивировании штамма-продуцента *Bacillus thuringiensis* K1 на питательной среде [30]. Концентрация меланина в ФР составляла 4-8 г/л.

Сорбцию меланина в динамических условиях проводили на колонке (6×70 см) при линейной скорости потока супернатанта по направлению снизу вверх, равной 0.034 см/с.

Элюцию меланина со смолы проводили 3.0% аммиачным раствором при скорости потока элюента через колонку по направлению сверху вниз, равной 0.015 см/с. Контроль за ходом процесса осуществляли измерением оптической плотности (ОП) раствора при 315 нм и сравнением полученной величины со значением ОП стандартного раствора синтетического меланина фирмы "Sigma".

ИК-спектры получали с использованием спектрометра типа "Nexus Nicolet FI-IR" (США) в таблетках KBr. Спектры ЭПР регистрировали при температуре 20°C на спектрометре типа "SE/X-2543 "Radiopan" (Польша) с высокочастотной модуляцией 100 кГц на частоте 9.4 ГГц. Спектральные измерения проводили на спектрометре "Perkin-Elmer 550SUV-VIS" (США).

## Результаты и их обсуждение

Так как концентрация меланина в полученном ФР низкая, наиболее эффективным является применение сорбционного способа выделения пигмента из супернатанта. Исследование процесса сорбции меланина из супернатанта в статических условиях показало, что равновесное состояние в изученной системе устанавливалось через 2-4 ч в зависимости от типа применяемого сорбента (таблица).

Из приведенных данных следует, что из всех исследуемых сорбентов наибольшей емкостью по меланину обладают аниониты и порошкообразный активированный уголь марки ОУ-В. Емкость гранулированного активированного угля АГС-4 мала, что, по-видимому, связано с меньшей удельной поверхностью этой марки угля [32].

Как видно из данных таблицы, количество сорбированного меланина существенно зависит от гранулометрического состава анионитов (опыты 8,9). Поэтому для лучшей сорбции пигмента крупные гранулы ионосорбента размалывали и использовали фракции (-0.63 – +0.2 мм).

Сорбция меланина на смоле ИА-1р, по-видимому, обусловлена селективным взаимодействием между сорбатом и матрицей смолы, образованной в результате поликонденсации формальдегида, *m*-фенилендиамина и резорцина [32].

Исходя из полученных данных в динамических условиях на смоле ИА-1р проводили выделение меланина из супернатанта. Сначала рН супернатанта снижали от 8.9 до 3.5, затем раствор пропускали через ионообменную колонку, заполненную смолой ИА-1р в СГ-форме. Далее смолу промывали обессоленной водой, после чего меланин элюировали аммиачным раствором. Собранный аммиачный элюат подвергали ва-

куумному упариванию до концентрации меланина 200-250 г/л и раствор высушивали в сушильном шкафу с продувкой горячего воздуха (50-55°C). В результате высушивания получается черно-коричневая аморфная масса с металлическим блеском [30].

Таблица

**Результаты сорбции меланина из супернатанта в зависимости от типа применяемого сорбента или смолы, величины pH раствора и размеров гранул смолы**

| Номер опытов | Наименование сорбента                                      | pH супернатанта | pH супернатанта после сорбции | Концентрация меланина в исходном супернатанте, г/л | Концентрация меланина в супернатанте после сорбции, г/л | Емкость смолы или сорбентов к меланину, мг/мл |
|--------------|------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1            | ИА-1р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.63÷+0.2 мм               | 4.0             | 4.3                           | 3.10                                               | 0.75                                                    | 79.0                                          |
| 2            | ИА-1р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.63÷+0.2 мм               | 5.0             | 5.1                           | 3.30                                               | 1.03                                                    | 75.8                                          |
| 3            | ИА-1р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.63÷+0.2 мм               | 6.2             | 6.9                           | 3.20                                               | 1.59                                                    | 53.8                                          |
| 4            | ИА-1р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.63÷+0.2 мм               | 7.5             | 7.3                           | 3.20                                               | 1.76                                                    | 48.0                                          |
| 5            | ИА-1р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.63÷+0.2 мм               | 8.9             | 8.4                           | 3.20                                               | 2.10                                                    | 37.6                                          |
| 6            | ИА-1р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.63÷+0.2 мм               | 12.4            | 11.8                          | 3.10                                               | 2.70                                                    | 11.6                                          |
| 7            | АВ-17 Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.75÷+0.5 мм               | 5.4             | 5.8                           | 3.20                                               | 2.52                                                    | 22.6                                          |
| 8            | Dowex Cl <sup>-</sup> форма<br>100-200 меш.                | 5.4             | 6.2                           | 3.20                                               | 1.13                                                    | 69.2                                          |
| 9            | АРА-8Р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.75÷+0.5 мм              | 5.0             | 5.5                           | 3.30                                               | 2.25                                                    | 35.0                                          |
| 10           | АРА-8Р Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.25÷+0.1 мм              | 5.0             | 5.5                           | 3.30                                               | 1.85                                                    | 48.3                                          |
| 11           | ЭДЭ-10П Cl <sup>-</sup> форма<br>-0.75÷+0.5 мм             | 5.4             | 5.8                           | 3.20                                               | 1.85                                                    | 45.0                                          |
| 12           | Уголь актив. марка ОУ-В                                    | 5.0             | 6.6                           | 3.30                                               | 1.00                                                    | 76.6                                          |
| 13           | Уголь актив. марка АГЦ-4                                   | 5.4             | 6.2                           | 3.20                                               | 2.90                                                    | 3.3                                           |
| 14           | КУ-2×8 Н <sup>+</sup> форма<br>-0.75÷+0.5 мм               | 5.4             | 1.6                           | 3.20                                               | 2.25                                                    | 28.3                                          |
| 15           | КУ-2×8 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> форма<br>-0.75÷+0.5 мм | 5.4             | 6.1                           | 4.10                                               | 3.98                                                    | 4.0                                           |
| 16           | Полисорб 1                                                 | 5.0             | 5.7                           | 3.30                                               | 3.26                                                    | 1.4                                           |
| 17           | КМ целлюлоза КМ-32                                         | 5.0             | 5.7                           | 3.30                                               | 3.25                                                    | 1.7                                           |
| 18           | Силикагель Ц-25И,<br>5/40 мк/м                             | 5.0             | 5.6                           | 4.20                                               | 4.12                                                    | 2.7                                           |

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использовали качественные реакции с окислителями. Установлено, что водный раствор пигмента обесцвечивается  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{HNO}_3$ . В присутствии небольшого количества  $\text{FeCl}_3$  из раствора пигмента выпадает коричневый хлопьевидный осадок, который исчезает при увеличении количества добавленной соли. Результаты указанных реакций показали присутствие в полученном пигменте хиноидных и фенольных структур, что подтверждает его меланиновую природу [23, 24].

В ряде работ для определения принадлежности пигментов к эумеланинам или феомеланинам предлагается использовать отношение интенсивностей поглощения при 650 и 500 нм. Так, у синтетических эумеланинов отношение  $D_{650/500}$  колебалось в диапазоне 0,25-0,33, а у синтетических феомеланинов – в диапазоне 0.1-0.14 [33,34]. Проведенные нами эксперименты показали, что отношение интенсивностей поглощения микробного и синтетического меланина при 650 и 500 нм составляло 0.328 и 0.315, соответственно, из чего следует, что оба меланина принадлежат к эумеланинам.

В ИК-спектре водорастворимого микробного меланина (рис 4) присутствовали полосы, характерные для меланинов [35, 36]. При сопоставлении ИК-спектров виноградных пигментов, пигментов, выделенных из природной и культивированной чаги, синтетического и полученного нами микробного меланина обнаруживается их сходство в отношении основных полос поглощения.

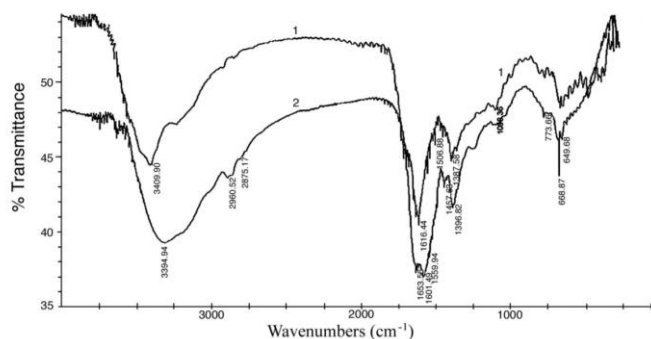


Рис. 4. ИК-спектры микробного (1) – разбавленного 1:200 и синтетического (2) – разбавленного 1:460 меланинов.

Особенностью меланинов как природных полимеров, содержащих развитые системы сопряженных связей, является наличие неспаренных электронов. Все меланины без исключения имеют ЭПР-поглощение в виде слегка асимметричного синглетного сигнала без сверхтонкой структуры с величиной  $g$ -фактора, варьирующей в пределах 2.003-2.004 [31].

Парамагнетизм природных меланинов оказывает существенное влияние на многие важные свойства: электропроводность, обменную

емкость, химическую реакционную способность, антиоксидантные свойства, биологическую активность и т.д.

На рис. 5 приведены ЭПР-спектры микробного и синтетического меланинов.

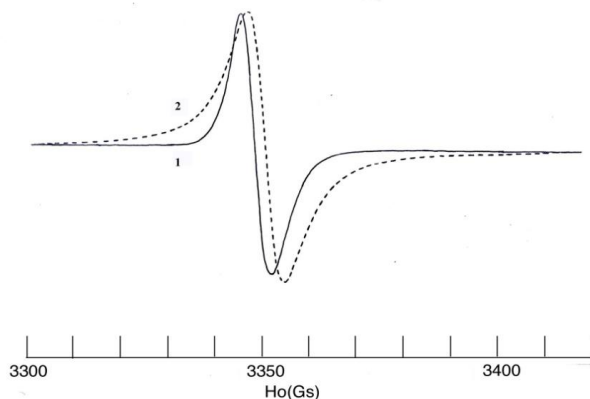


Рис. 5. Спектры ЭПР меланинов микробного(1) и синтетического (2) происхождения.

Спектр микробного меланина представлял собой слегка асимметричный синглет без сверхтонкой структуры с шириной линии между точками максимальной крутизны около 7 гаусс и значением  $g$ -фактора, равным 2.003. Двойное интегрирование этого спектра показало, что в нем содержится  $0.21 \times 10^{18}$  спин/г парамагнитных центров. Спектр синтетического меланина был также синглетным, но линия поглощения представляла уже лоренцевую форму с  $g$ -фактором, равным 2.004, и шириной около 8 гаусс. Число неспаренных электронов в нем  $0.37 \times 10^{18}$  спин/г.

Исследования показали, что в структуре микробного меланина имелись два типа парамагнитных центров, один из которых являлся лабильным, а другой — стабильным [36].

Изучено также влияние температурного воздействия на свойство микробного меланина [37]. Установлено, что аморфный осадок меланина устойчив при  $120^\circ\text{C}$ . При повышении температуры среды (до  $200^\circ\text{C}$ ), по-видимому, начиналась деградация меланина, что приводило к частичному нарушению его структуры. В результате этого меланин терял способность растворяться в воде. При кипячении в щелочной среде меланин, по-видимому, восстанавливал первоначальную структуру и растворялся в воде. При температуре выше  $350^\circ\text{C}$  меланин подвергался разрушению и поэтому терял способность растворяться как в щелочной, так и кислой средах.

Исходя из данных гель-хроматографии (молекулярная масса микробного меланина составляла 4 кДа) и элементного анализа, водорастворимый меланин из культуры *Bacillus thuringiensis* serovar K1 имеет следующую эмпирическую формулу:  $\text{C}_{185} \text{H}_{257} \text{O}_{62} \text{N}_{40}\text{S}$ .

Препараты меланина были успешно использованы в сельском хозяйстве в качестве биостимулятора роста растений и в медико-биологических исследованиях.

### **Выделение и очистка биоингибирующего продукта из культуральных жидкостей**

Биоингибирующие вещества в основном представляют собой синтезируемые бактериями (бактериоцины) или дрожжами (микоцины) продукты, которые друг от друга отличаются по молекулярному весу, химическому составу и спектру влияния [38].

За последние два десятилетия получение новых биоингибирующих продуктов приобрело более актуальный характер, т. к. увеличилось число бактерий, устойчивых к влиянию антибиотиков, что приводит к увеличению распространения болезней среди как населения, так и животных [39].

Биоингибирующие вещества имеют различную природу [40].

В литературе опубликовано много работ, посвященных классификации бактериоцинов [38-42], а также биосинтезу и выделению их из культуральных жидкостей (КЖ) в лабораторных условиях. В некоторых работах выделение бактериоцина из КЖ осуществляют центрифугированием, после чего фугат подвергают ультрафильтрации [40-43]. Далее из пермеата бактериоцин осаждают высаливанием сульфатом аммония, выделившийся осадок растворяют в растворе цитрата натрия и диализуют. Диализат подвергают гель-фильтрации. Собранные фракции объединяют и лиофильно высушивают. Сухую массу растворяют в воде и пропускают через колонку, заполненную карбоксиметилцеллюлозой. Со смолы целевой продукт элюируют раствором хлорида натрия. Собранные активные фракции смешивают, подвергают диализу и фракционируют с помощью ВЭЖХ. Активные фракции смешивают, лиофильно высушивают и после растворения в воде проверяют бактериоцидные свойства.

Предложенные подходы выделения и очистки биоингибирующих продуктов из КЖ в основном имеют исследовательский характер и являются нетехнологичными.

Цель исследования заключалась в разработке эффективного технологического способа выделения и очистки биоингибирующего продукта из КЖ молочнокислых бактерий, имеющего высокое бактериоцидное действие.

## Экспериментальная часть

КЖ биоингибирующих веществ условно анаэробных штамов (*Lactobacillus acidophilus* 1991 ВКПМ 6257 и *Lactobacillus rhamnosus* 2012 ИНМИА 9614), полученную после выращивания в среде MRS при температуре 37°C в течение 48 ч, подвергали центрифугированию в течение 20 мин при 2900g. Супернатант подвергали ультрафильтрации путем пропускания его через разделительный ультрафильтрационный аппарат с полыми волокнами AP-02 периодического действия. Далее пермеат подвергали упариванию в вакууме до достижения СВ в пермеате 27-30%. Для осаждения целевого продукта к 30 мл упаренного пермеата при перемешивании добавляли сульфат аммония до достижения степени насыщения раствора 30-80%. рН упаренного раствора составлял 3.5 и 6.5. После 20-минутного перемешивания массу выдерживали при 4°C в течение 20 ч. Образовавшийся осадок отделяли от раствора центрифугированием в течение 15 мин при 5400g.

Сорбционный процесс выделения биоингибирующего вещества из супернатанта КЖ осуществляли пропусканием раствора через две последовательно соединенные ионообменные колонки. Первая колонка заполнена катионитом КУ-2×8, а вторая — анионитом ЭДЭ-10П в  $H^+$  и  $OH^-$  формах, соответственно. Линейная скорость потока супернатанта по направлению снизу вверх составляла 0.034 см/с. Сорбированный целевой продукт со смолы элюировали аммиачным раствором. Фракции, обладающие биоингибирующим свойством, объединяли и подвергали вакуум-упариванию до СВ раствора 50-52%, и после разбавления определяли биоингибирующую активность полученного продукта.

Экстракцию биоингибирующего продукта из элюата осуществляли добавлением к 20 мл элюата определенного количества органического растворителя соответствующего типа и после 10-минутного экстрагирования массу оставляли на расслоение, после чего органический слой отделяли от водного. Вакуум-упариванием экстракта органический растворитель отделяли от водного слоя и определяли биоингибирующую активность упаренных растворов. Упаренный водный раствор присоединяли к исходному супернатанту для ионообменной очистки.

Содержание биоингибирующего продукта в различных образцах определяли методом образования ингибирующей зоны на тест-культурах.

В работе условной единицей антибактериальной активности (Аи/мл) считалась величина разбавления, при которой образец проявлял минимальную зону (2 мм) подавления роста тест-культур.

В качестве исследуемых тест-культур использовали условно-патогенные бактерии родов *Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* Г-38 и *Bacillus Subtilis* Г-17-89.

## Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что с помощью высаливания сульфатом аммония при различных значениях pH раствора целевого продукта не удается количественно провести осаждение биоингибирующего продукта из упаренного пермеата независимо от степени насыщения раствора от 35 до 80%, соответственно. По-видимому, причина невыпадения осадка связана с его небольшим молекулярным весом (700-1100 D) [44], низким содержанием в КЖ, а также высокой растворимостью.

Учитывая вышесказанное, для выделения целевого продукта из супернатанта применен метод ионообменной хроматографии пропусканием раствора биоингибирующего продукта через сульфокатионит и среднеосновной анионит, соответственно [45-46]. Обменная емкость анионита к целевому продукту составляла 1280 ед/мл.

Исследования показали, что на стадии ионного обмена ~77% от общего количества СВ исходного супернатанта как примеси очищается от целевого продукта. В процессе сорбции 79% биоингибирующего продукта сорбируется на смоле.

Фракции элюата, имеющие биоингибирующее свойство, подвергались вакуум-упарке до содержания СВ в растворе 52%. Активность биоингибирующего продукта в упаренном растворе 5800 ед/мл. Выход целевого продукта на стадии ионного обмена ~67%.

Показано, что при ионообменном методе выделения биоингибирующего продукта из супернатанта только частично удастся очистить целевой продукт от сопутствующих примесей. Для доочистки полученного элюата от примесей нами применялся экстракционный способ. В качестве экстрагента использовали органические растворители различного характера.

Из применяемых органических растворителей сравнительно эффективным оказались диметил- и диэтилкетоны и ацетонитрил. Высокая экстрагирующая способность вышеуказанных соединений, по-видимому, связана с большой величиной их дипольных моментов.

Микробиологическим анализом установлено, что полученный упаренный экстракт подавляет рост условно-патогенных (*E. Coli*, *S. typhimurium* и *B. Subtilis*) и патогенных (*Staphylococcus aureus*-21G, *Pseudomonas aeruginosa*-12, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* 597) культур в 200-кратном разбавлении полученных образцов.

Исследования показали, что при экстракции ~62-65% биоингибирующего продукта из элюата переходит в органическую фазу. Если

учесть, что оставшиеся в водном растворе ~38-35% биоингибирующего продукта после отгонки экстрагента возвращаются на стадию ионнообменной очистки, то выход целевого продукта на стадии экстракции можно довести до 97%. Выход целевого продукта из супернатанта с учетом возврата растворов в технологический цикл составляет ~64%.

Авторы работы [47], исследующие продукты метаболизма, полученные в процессе культивирования аналогичных штаммов молочнокислых бактерий, показали, что антимикробное свойство конечного продукта связано с наличием в нем низкомолекулярного пептида. С помощью масс-спектрометра (MALDI-TOF/TOF) определен молекулярный вес пептида (1.1 КДа), а секвенированием установлено, что он состоит из 11 аминокислотных остатков следующего состава: Asn-Val-Gly-Val-Leu-X-Pro-Pro-X-Leu-Val.

Преимущество разработанного комбинированного способа выделения и очистки биоингибирующего продукта заключается в том, что с помощью ионообменной хроматографии из КЖ выделяется частично очищенный упаренный раствор биоингибитора, из которого путем экстракции малым объемом органического растворителя получается очищенный от неорганических и органических примесей продукт, имеющий сильное биоингибирующее действие на патогенные микроорганизмы.

Проведенные исследования позволили с использованием различных технологических подходов разработать эффективные технологии выделения и очистки различных классов БАВ из ФР, которые запатентованы в девяти патентах.

## **ՖԵՐՄԵՆՏԱՑԻՈՆ ՆԵՂՈՒԿՆԵՐԻՅ ՏԱՐԲԵՐ ԴԱՍԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԵՎ ՄԱՔՐՄԱՆ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՏԱԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

**Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Գ. Ժ. ՆՈՎՆԱՆՆԻՍՅԱՆ, Կ. Ի. ԵՂՅԱՆ և Ա. Ս. ՍԱՂՅԱՆ**

*Ուսումնասիրվել են ֆերմենտացիոն հեղուկներից (ՖՀ) տարբեր դասերի կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի անջատման և մաքրման գործընթացները, որոշվել այդ պրոցեսների օրինաչափությունները և տեխնոլոգիական ցուցանիշները ու մշակվել ՖՀ-ից նրանց անջատման և մաքրման արդյունավետ տեխնոլոգիաները:*

*Մշակվել է առանց սորբցիոն հղանակի կիրառման ՖՀ-ից վալինի անջատման գործընթացը: Որոշվել են ազաթթվից վալինի տեխնիկական բյուրեղների վերաբյուրեղացման օպտիմալ տեխնոլոգիական ցուցանիշները ու էլեկտրաթաղանթային հղանակով վալինը հիդրոթերմիկ ձևից ցվիտտերիտի փոխարկման հնարավորությունը:*

*Ուսումնասիրվել է ՖՀ-ի պերմեատից էլեկտրոդիալիզի հղանակով նատրիումի ցիտրատի տրանսֆորմացիան կիտրոնաթթվի ու ցուլց է տրվել, որ տեխնոլոգիապես նախընտրելի է աղի փոխարկումը թթվի իրականացնել մինչև 90-95%, իսկ մնացորդային ցիտրատի փոխարկումը կիտրոնաթթվի ու լուծույթի ազազրկումը իրականացնել իոնափոխանակային հղանակով:*

*Ուսումնասիրվել է ՖՀ-ի վերնատվածքային հեղուկից իոնափոխանակային եղանակով միկրոբային մեկանիների անջատման գործընթացը և որոշվել են սորբցիայի և էլյուցիայի օպտիմալ տեխնոլոգիական ցուցանիշները:*

*Ուսումնասիրվել են անջատված միկրոբային մեկանիների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները ու պարզվել կառուցվածքային մի շարք առանձնահատկություններ:*

*Մշակվել է կուլտուրալ հեղուկներից կենսաարգելակիչ նյութերի անջատման և մաքրման արդյունավետ եղանակ, ինչը հնարավորություն է տալիս ստանալ ուղեկցող խառնուրդներից մաքրված ախտածին մանրէների աճը արգելակող բարձր կենսաարգելակիչ հատկությամբ օժտված արգասիք:*

## **TECHNOLOGICAL FEATURES IN ISOLATION AND PURIFICATION OF VARIOUS CLASSES OF BAS FROM FERMENTATION SOLUTIONS**

**A. E. AGHAJANYAN, G. J. HOVHANNISYAN, K. I. YEGHIYAN and A. S. SAGHYAN**

Scientific and Production Center «Armbiotechnology" NAS RA

14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

Fax: (37410)654183

E-mail: armbiotech@gmail.com

The processes of isolation and purification of various classes of biologically active substances (amino acid, citric acid, microbial melanin and bioinhibiting substances) from fermentation solutions (FS) of microbial synthesis were studied, the regularities of these processes revealed, their technological parameters worked out and efficient technologies for isolation and purification of the afore-mentioned compounds from FS created.

The sorption-free process for L-valine isolation from the FS was developed. Optimal technological parameters for crystallization of valine technical crystals from hydrochloric acid solution and those for electromembrane method for valine transfer from hydrochloride form to zwitterion form were determined.

The process of sodium citrate transformation to citric acid from the FS permeate by electrodialysis was investigated and for the first time it has been shown that it is technologically preferable to carry out transformation up to 90-95%, and to conduct the transformation of the residual citrate after electrodialysis and solution desalting by the ion-exchange procedure.

The process of microbial melanin isolation from native solution with ion-exchange resins depending on the nature and structure of resins and physico-chemical characteristics of sorbate and sorbent was explored.

The optimal technological parameters of sorption and elution were established.

Physico-chemical properties of the isolated microbial melanin were studied and a number of structural peculiarities revealed.

The technologically available efficient method for isolation of the bioinhibiting substance from FS has been elaborated. Its essence is that a partially purified evaporated solution of bioinhibitor is isolated from the native solution by ion-exchange chromatography. From the latter by extraction with a small amount of organic solvent, a product purified from inorganic and organic impurities is obtained, which has a strong bioinhibiting action on pathogenic microorganisms.

The performed investigations allowed to develop efficient technologies for isolation and purification of various classes of BAS from FS using different technological approaches.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Simg S.P, Verma I.N.* // Biotechnol. Dull., 1987, v.5, №2, p. 5.
- [2] *Карабеков Б.П., Мурадян А.Г., Хачатурян Р.М., Манешин В.В., Агаджанян А.Е.* Разовый технологический регламент на производство высокоочищенного L-валина, №01-85, Ереван, НПО "Армбиотехнология", 1987, 248 с.
- [3] А. с. СССР N 1426041, МКИ C12P 13/08, 1985.
- [4] *Солдатов В.С., Куваева З.И., Бычкова В.А., Водопьянова Л.А.* // ЖФХ, 1999, т. 73, №6, с. 935.
- [5] Патент США N 4661606, МКИ C07D209/20, 1987.
- [6] *Куваева З.И., Солдатов В.С., Рыскал В.А.* Опытнo-промышленный регламент на производство L-валина, Трипольский биохимический завод, 1988, 69 с.
- [7] *Արմնիադիր* N 98001 ՀՀ, ՄԱԴ C07 C99/12, 1999.
- [8] *Агаджанян А.Е., Оганесян Г.Ж., Агаджанян Е.А.* // Хим. ж. Армении, 2002, т. 55, №4, с. 121.
- [9] *Фелднер В.А., Пейча Дз.А, Вискна А.Э.* // Изв. АН Латв. ССР, 1988, №2, с.216.
- [10] *Агаджанян А.Е., Варданян А.А., Сагиян А.С.* // Биотехнология, 2007, №4, с.41.
- [11] *Карабеков Б.П., Хачатурян Р.М., Манешин В.В.* Опытнo-промышленный регламент на производство L-фенилаланина кристаллического и кормового концентрата №64-1761-08-88. Ереван, НПО "Армбиотехнология", 1988, 325 с.
- [12] А. с. СССР №715572, 1980.
- [13] *Смирнов В.А.* Пищевые кислоты. М., Пищевая промышленность, 1983, 425 с.
- [14] Патент EP №0460854, C07C51/42, 1987.
- [15] Патент США №5426220, C07C 51/41, 1996.
- [16] Патент России №2090611, C12P7/48; B01D15/04, 1997.
- [17] Патент Италии №1256043, C12K, 1995.
- [18] *Лемба Я.К., Крамзака И.Р., Карклин Р.Я.* // Изв. АН Латв. ССР, 1988, №2, с. 77.
- [19] *Novalic S., Okwor J., Ruble K.* // Desalination, 1996, v. 105, №3, p. 277.
- [20] *Цатурян А.О.* // Хим. ж. Армении, 2013, т. 66, №1, с. 140.
- [21] *Агаджанян А.Е.* // Хим. ж. Армении, 2005, т. 58, №4, с. 122.
- [22] Патент России N2191828, C12P7/48; B01D15/04, 2002.
- [23] *Лях С.П.* Микробный меланогенез и его функция. М., Наука, 1981, 274 с.
- [24] *Prota G.* Melanins and Melanogenesis. N.-Y.: Acad. Press, 1992, 290 p.
- [25] *Барцевская М.И., Васильева С.М.* // Вопросы медицинской химии, 1999, №1, с. 3.
- [26] Патент США №5618519, C12P17/14, 1997.
- [27] Патент России №2083214, A61K 35/36, 1997.
- [28] USA Patent Application №20020041905, A1A61K035/78, 2002.
- [29] Патент России №2186105, C2 C12N1/14, 2002.
- [30] Патент Армении №1385, A2 C12P 17/00, 2003.
- [31] *Макардей Ф.В., Венгер Л.А., Слюсаренко Л.И., Барба И.Н.* // Изв. вузов. Химия и химическая технология, 1994, №4-6, с. 3.
- [32] *Агаджанян А.Е.* // Биотехнология, 2006, №1, с. 36.
- [33] *Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Thody A.J.* // Pigment Cell Res., 1996, v. 9, p. 265.
- [34] *Wakamatsu K., Ito S.* // Pigment Cell Res., 2002, v. 15, p. 174.
- [35] *Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Бабицкая В.И.* // Прикл. биохимия и микробиология, 2002, №1, с. 68.
- [36] *Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S., Asaturian A.A., Vardanyan A.A., Saghiyan A.S.* // Pigment Cell Res., 2005, v. 18, p. 130.

- [37] *Aghajanyan A.E., Asaturian A.A., Hambardzumyan A.A., Sargsyan L.B., Hovsepyan A.S., Vardanyan A.A., Saghiyan A.S.* // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, v. 47, №5, p. 500.
- [38] *Juan C., Oscariz G., Pisabarro* // *Int. Microbiol*, 2001, №4, p. 13.
- [39] *Yoneyama H., Katsumata R.* // *Biosci Biotechnol. Biochtm*, 2006, v. 70, №5, p. 1060.
- [40] *Kozak W., Dardoeski J.* // *Lactocin-a bacteriocin produced by Streptococcus Lactis* // *Bull. Acad. Pol. Sci*, 1977, v. 25, p. 217.
- [41] *Chung-Hoi Kim, Geun-Eog Ji, Cheol Ahn* // *Food Sci. Biotechnol.*, 2000, v. 9, №4, p. 270.
- [42] *Todorow S., Onno B., Sorokin O.* // *International Journal of Food Microbiology*, 1999, v. 48, p. 167.
- [43] *Lu R., Fasano S., Madayiputhiya N., Morin N., Nataro J., Fasano A.* // *J. Pediatier Gastroenterol Nutr.*, 2009, v. 49, p. 23.
- [44] *Tkhruni F.N., K.J. Karapetyan, S.C. Chailyan.* // *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, September, special issue, p. 57.
- [45] Патент Армении №1723A2, C12P 1/04, 2006.
- [46] Патент Армении №2925A, C12P 1/04, 2015.
- [47] *Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberg S., Zloh M.* // *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, v. 35, p. 255.

## ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 661.887.27:536.717

### ИССЛЕДОВАНИЕ БОГАТОЙ $\text{TeO}_2$ ОБЛАСТИ ДИАГРАММЫ СОСТОЯНИЯ БИНАРНОЙ СИСТЕМЫ $\text{Bi}_2\text{O}_3$ – $\text{TeO}_2$

Исследование бинарной системы  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ – $\text{TeO}_2$  представляет практический интерес для создания новых стеклообразных и стеклокристаллических материалов, сочетающих легкоплавкость и широкий интервал изменения ТКЛР. Однако сведения о диаграмме состояния системы  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ – $\text{TeO}_2$  весьма ограничены, а данные противоречивы. Так, авторами [1] и [2] построены диаграммы состояния данной системы, в которых выявлены пять бинарных соединений:  $\text{Bi}_{10}\text{Te}_2\text{O}_{19}$ ,  $\text{Bi}_{16}\text{Te}_5\text{O}_{34}$ ,  $\text{Bi}_2\text{TeO}_5$ – $\text{Bi}_2\text{Te}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ . В богатой  $\text{TeO}_2$  области составов 78–92 мол.%  $\text{TeO}_2$  не совсем понятен, на наш взгляд, характер плавления соединения  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  и, исходя из этого, построенные данные участки диаграмм. В одном случае, по данным [1], оно имеет конгруэнтное плавление при  $662^\circ\text{C}$  и находится между двумя эвтектиками, в другом случае — оно имеет инконгруэнтный характер плавления с т. пл.  $645^\circ\text{C}$  [2]. В связи с этим нами была предпринята попытка ревизии как всей диаграммы, так и, в частности, области, содержащей 75–100 мол.%  $\text{TeO}_2$ . Для исследований были использованы «ос.ч.»  $\text{TeO}_2$  и  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ .

Благодаря использованию метода сверхбыстрого охлаждения расплава нами впервые удалось выявить область стеклообразования в богатой  $\text{TeO}_2$  области составов бинарной системы  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ – $\text{TeO}_2$ . Расплавы данной области составов обладают повышенной кристаллизационной способностью, поэтому не образуют стекол при традиционных методах стеклообразования. Для увеличения скорости охлаждения расплавов, кристаллизующихся при медленном охлаждении, расплавы стекол закалялись между двумя быстро вращающимися металлическими вальцами с получением прозрачных стекловидных плёнок [3,4]. Согласно [4], сверхбыстрое охлаждение расплава происходит исключительно за счет теплопроводности и резкой, мгновенной закалки расплавов от темпера-

туры варки до комнатной. Таким образом, регулируя в каждом конкретном случае температуру варки, скорость вращения валцов и зазор между ними, нашей группе удалось впервые синтезировать стекла во многих "экзотических" титанатных, висмутатных др. системах [5-7]. На сконструированной нами установке достигается скорость охлаждения расплавов от  $10^2$  до  $10^4$  К/с и формируются стеклообразные плёнки толщиной от 30 мкм. Масса валцов рассчитана таким образом, чтобы исключить их нагрев при формовании плёнки стекла из 50 г расплава с температурой 1600°C. Варки стекол проводились в тиглях из кварцевого стекла при 800-1000°C в электрических печах, в атмосфере воздуха. Образцы для исследований были получены также твердофазным синтезом из исходных оксидов. Идентификацию продуктов, образующихся при кристаллизации и в результате твердофазного синтеза стекол, проводили дифференциально-термическим (дериватограф "Q-1500", скорость нагрева 10°C/мин) и рентгенофазовым ("ДРОН-4", Си -анод) анализами. На основе данных ДТА и РФА была построена новая версия участка диаграммы состояния бинарной системы  $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{-TeO}_2$ , содержащей 75-100 мол.%  $\text{TeO}_2$  (рис.1).

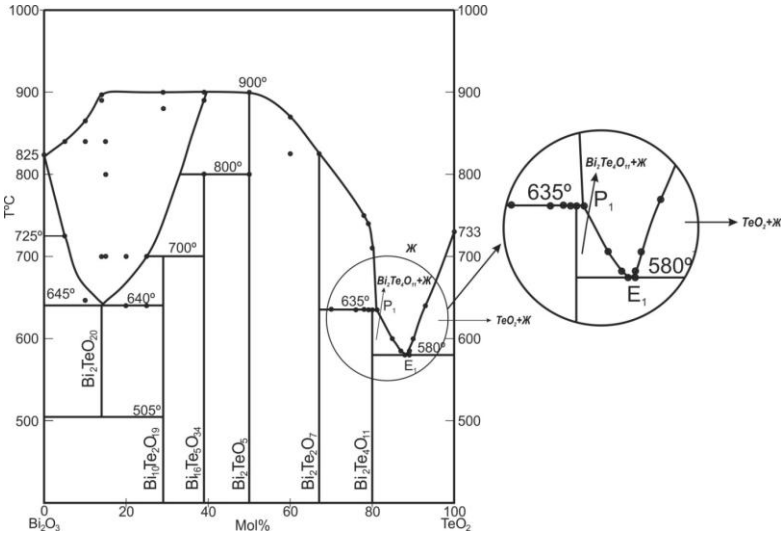


Рис. 1. Корректированная версия участка диаграммы состояния бинарной системы  $\text{TeO}_2$  и  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , содержащей 75-100 мол. %  $\text{TeO}_2$ .

Нами подтверждены данные авторов [1,2] о существовании эвтектики  $E_1$  (87 мол.%  $\text{TeO}_2$ ) между  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  и  $\text{TeO}_2$  с температурой плавления  $580 \pm 5^\circ\text{C}$  (рис. 1). Для дальнейшего построения диаграммы нами был исследован характер плавления соединения  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ . На кривой ДТА стекла состава 80 мол. %  $\text{TeO}_2$  — 20 мол.%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , соответствующего соединению  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ , наблюдаются четко выраженный экзоэффект с максимумом при 420°C и два эндоэффекта с минимумами при 635 и 720°C

(рис.2А). Продуктом кристаллизации при 420°С стеклопорошка состава  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  является соединение  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  с параметрами:  $d(\text{\AA})/I$  (3.29/100, 3.17/37, 3.13/47) PDF карта 01-081-1330 [8], плавящееся при  $635 \pm 5^\circ\text{C}$ , что совпадает с данными [1,2]. Второй эндотермический эффект на кривой ДТА в интервале 680-765°С с температурным минимумом при 720°С связан с растворением в расплаве  $\text{TeO}_2$ , выделяющегося во время инконгруэнтного плавления  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  (рис. 2А). Инконгруэнтный характер плавления способствует образованию перитектики  $P_1$  (81 мол.%  $\text{TeO}_2$ ) с т.пл.  $635 \pm 5^\circ\text{C}$  между  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  и эвтектикой  $E_1$  (87 мол.%  $\text{TeO}_2$ ) (рис. 1).

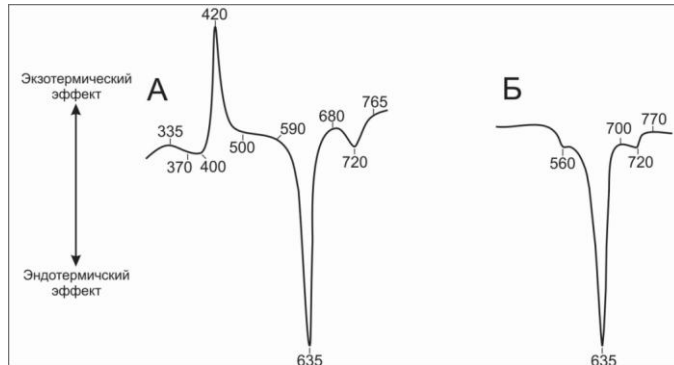


Рис. 2. Кривые ДТА порошков соединения  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ , полученных в виде стекла (А) и твердофазовым синтезом (Б).

Известно, что кристаллический  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  существует в двух модификациях: моноклинной и кубической [2]. На кривой ДТА соединения  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ , полученного твердофазным синтезом (рис. 2Б), наблюдаются три эндотермических эффекта при 560 , 635 и 720°С. Последние два эффекта совпадают с таковыми на кривой ДТА стеклообразного образца (рис. 2А) и связаны с инконгруэнтным характером плавления  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ . А эндотермический эффект при 560°С связан с фазовым переходом моноклинной модификации  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  в кубическую (рис. 2Б).

## **$\text{Bi}_2\text{O}_3$ - $\text{TeO}_2$ ԲԻՆԱՐ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ՎԻՃԱԿԻ ԴԻԱԳՐԱՄԻ ԹԵԱԼՈՒՐՈՎ ՀԱՐՈՒՄՏ ՀԱՏՎԱԾԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

### **Ա. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ**

*$\text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{TeO}_2$  համակարգը ուսումնասիրվել է հալույթների գերսառեցմամբ ստացված ապակիների և պնդաֆազ ռեակցիաներով սինթեզված միացությունների զինֆերենցիալ ջերմային և ռենտգենաֆազային անալիզներով: Արդյունքում կառուցվել է  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ - $\text{TeO}_2$  համակարգի վիճակի դիագրամի նոր տարբերակ: Հաստատվել է  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ -ի և  $\text{TeO}_2$ -ի միջակայքում  $E_1$  (87 մոլ.%  $\text{TeO}_2$ ) էվտեկտիկ բաղադրության առկայությունը՝ 580°С հալման ջերմաստիճանով և  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  միացության ինկոնգրուենտ հալմամբ պայմանավորված  $P_1$ (81 մոլ.%  $\text{TeO}_2$ ) պերիտեկտիկ բաղադրության առկայությունը  $635 \pm 5^\circ\text{C}$  հալման ջերմաստիճանով:*

*Ուսումնասիրվել է նաև  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  միացության հալման վարքագիծը:*

# STUDY OF THE TELLURITE-RICH COMPOSITION RANGE IN THE $\text{Bi}_2\text{O}_3$ - $\text{TeO}_2$ SYSTEM

A. A. GHAZARYAN

Institute of Electronic Materials  
119, Arshakunyats Str., Yerevan, 0007, Armenia  
Tel: (374-10)445417, E-mail: alxas88@mail.com  
Institute of General and Inorganic Chemistry of NAS RA  
10, Argutyan Str., District 2, Yerevan, 0051, Armenia

The  $\text{TeO}_2$  and  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  based glasses and glass ceramics are widely used for various technical needs. However, information about the phase diagram of the  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ - $\text{TeO}_2$  system is limited, and the existing data are inconsistent. According to Demina L.A. with co-authors the  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  compound has a congruent melting at  $662^\circ\text{C}$  and forms two eutectics with neighbors. In another case, according to the Schmidt P. with co-authors, it melts incongruently at  $645^\circ\text{C}$  without indication of Liquidus temperature. It was the motivation for the  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  melting behavior investigation and the binary  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ - $\text{TeO}_2$  system phase diagram correction in the  $\text{TeO}_2$  rich area of compositions. As initial materials the glass and solid state sintered samples were used for these purposes. The differential thermal and X-ray analyses were used for glassy and crystallized products identification. The exothermic effect with maximum at  $420^\circ\text{C}$  and two endothermal effects with minimum at  $635^\circ\text{C}$  and  $720^\circ\text{C}$  are clearly observed on the DTA curve of the 80  $\text{TeO}_2$ -20  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  (mol.%) glass composition corresponding to the  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  compound. The product of  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  glass powder crystallization at  $420^\circ\text{C}$  is the  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  compound with melting point of  $635 \pm 5^\circ\text{C}$ . The second endothermic effect on the DTA curve in the range of temperature  $680$ - $765^\circ\text{C}$  with minimum at  $720^\circ\text{C}$ , is associated with dissolution of  $\text{TeO}_2$  in the melt, formed as result of the  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  incongruent melting. The existence of eutectic  $E_1$  (87 mol.%  $\text{TeO}_2$ ) between  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  and  $\text{TeO}_2$  with a melting point of  $580 \pm 5^\circ\text{C}$  has been confirmed. Incongruent melting promotes the peritectic  $P_1$  (81 mol.%  $\text{TeO}_2$ ) formation between  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  and eutectic  $E_1$  (87 mol.%  $\text{TeO}_2$ ) with a melting point of  $635 \pm 5^\circ\text{C}$ . Three endothermic effects at  $560^\circ\text{C}$ ,  $635^\circ\text{C}$  and  $720^\circ\text{C}$  have been observed on the DTA curve of  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  compound, obtained by solid state synthesis. Last two endoeffects are the same as on DTA curve of glass sample, and associated with incongruent melting of  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$ . An endothermic effect at  $560^\circ\text{C}$  is connected with phase transition from monoclinic modification of  $\text{Bi}_2\text{Te}_4\text{O}_{11}$  to the cubic.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Демина Л.А., Долгих В.А., Поповкин Б.А., Новоселова А.В. // ДАН СССР, 1979, т. 244, №1, с.94.
- [2] Schmidt P., Oppermann H. // Z.anorg.allg.Chem., 1997, v.623, p. 174.
- [3] Гамаюнов К.В., Осико В.В., Татаринцев В.М. // ДАН СССР, 1984, т.277, №6, с.1426.
- [4] Гамаюнов К.В., Осико В.В., Татаринцев В.М. // ДАН СССР, 1984, т.279, №4, с.912.
- [5] Hovhannisyan R.M., Alexanyan H.A., Hovhannisyan M.R., Petrosyan B.V., Harutyunyan V.A. / in: Ferroelectrics-Physical Effects, InTech publishing, Croatia, 2011, p.49.

- [6] *Hovhannisyan M.R.* / in: *Advances in Ferroelectrics*, InTech publishing, Croatia, 2013, p.127.
- [7] *Barseghyan A.H., Hovhannisyan R.M., Petrosyan B.V., Alexanyan H.A., Toroyan V.P.* // *Phys. Chem Glasses: Eur. J. Glass Sci. Technol. B*, 2013 , v.54, №5, p. 199.
- [8] International Center for Diffraction Data(ICDD), PDF-2 release 2008, Version 2.0804, Pennsylvania, USA.

Институт электронных материалов

**А. А. КАЗАРЯН**

Армения, 0007, Ереван, пр. Аршакуняц, 119

Тел: (374-10)445417, E-mail: alxas88@mail.com

Институт общей и неорганической химии им. М. Г. Манвеляна

НАН Республики Армения

Армения, 0051, Ереван, ул. Аргутяна, 2-ой пер., д. 10

Поступило 28 IX 2015

## ГОДОВОЙ УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ И СТАТЕЙ

- Авакян А.С.*, см. *Вартанян С.О.* №2, с. 251.
- Аветисян А.Г.*, см. *Дунамалян Л.А.* №3, с. 347.
- Аветисян К.С.*, см. *Галстян Л.Х.* №4, с. 507.
- Агаджанян А.Е., Оганисян Г.Ж., Егиян К.И., Сагиян А.С.* Технологические особенности выделения и очистки различных классов биологически активных веществ из ферментационных растворов. №4, с. 532.
- Агекян А.А.*, см. *Арустамян Ж.С.* №1, с. 99  
*Вартанян С.О.* №2, с. 251.
- Айдинян С.В., Киракосян А.В., Ниазян О.М., Харатян С.Л.* ДТА/ТГ исследование карботермического восстановления молибдата меди. №2, с. 196.
- Айоцян С.С., Асратян А.Г., Конькова С.Г., Хачатрян А.Х., Бадасян А.Э., Саргсян М.С.* О хемоселективности внутримолекулярной циклизации при взаимодействии аральдиминов и ариламинов ацетоуксусной кислоты. №2, с. 266.
- Айрапетян С.А., Варданян Л.Р., Варданян Р.Л.* Содержание и активность антиоксидантов этилацетатных экстрактов растений, произрастающих в Горисском регионе Армении. №1, с. 40.
- Айриян Э.Х., Мирзоян Л.А., Оганян Н.А., Багдасарян Л.С.* О химизме взаимодействия основного красителя нильского голубого с молибдофосфорной гетерополикислотой. №1, с. 57.
- Алебян З.Г.*, см. *Галстян Л.Х.* №4, с. 507.  
*Топузян В.О.* №1, с. 122, с. 129.
- Алексян М.С.*, см. *Дарбинян Г.Г.* №2, с. 226.
- Амбарцумян А.А.*, см. *Дадаян С.А.* №1, с. 71.
- Амбарцумян Э.Н., Ворсканян А.С., Григорян А.А., Енгоян А.П.* Синтез производных 5-([1,3,5]-триазирилтиоалкил)-[1,3,4]-оксадиазол-3H-2-тионов. №4, с. 514.
- Ананикян Г.С., Мнацаканян В.А., Паносян Г.А., Саргисян С.А.* Флаволигнаны расторопши Арцах. №1, с. 51.
- Апоян С.А.*, см. *Григорян Дж.Д.*, №4, с. 480.
- Арсентьев С.Д.*, см. *Давтян А.Г.* №3, с. 358, 367.  
*Погосян Н.М.* №1, с. 11.
- Арустамян Ж.С., Маркарян Р.Э., Агекян А.А., Мурадян Р.Е., Асатрян Т.О., Минасян Н.С.* Синтез и изучение антиаритмической активности ряда новых амидов на основе 1-(3,4-диметоксифенил)циклоалкан-1-метиламинов. №1, с. 99.
- Арутюнов В.С.*, см. *Погосян Н.М.* №1, с. 11.
- Арутюнян А.А.* Синтез новых 2,4,5,6-тетразамещенных пиримидинов. №1, с. 81.
- Арутюнян А.Б.*, см. *Григорян Г.Л.* №3, с. 376.
- Арутюнян А.Д.*, см. *Геворкян К.А.* №2, с. 259.
- Арутюнян В.С.*, см. *Кочикян Т.В.* №1, с. 153.

- Арутюнян Г.Л., см. Геворкян К.А. №2, с. 259.
- Арутюнян Л.А., см. Манукян З.О. №2, с. 183.
- Тавадян Л.А. №3, с. 339.
- Асатрян Р.С., см. Давтян А.Г. №3, с. 358, 367.
- Асатрян Т.О., см. Арустамян Ж.С. №1, с. 99.
- Асратян А.Г., см. Айцоян С.С. №2, с. 266.
- Асратян А.Г. Реакции салицилальдиминов с амидоэфирами малоновой кислоты. №2, с. 244.
- Аттарян О.С., см. Данагулян Г.Г. №2, с. 233.
- Багдасарян Л.С., см. Айриян Э.Х. №1, с. 57.
- Бадасян А.Э., см. Айцоян С.С. №2, с. 266.
- Бегларян А.А., см. Григорян Г.Л. №3, с. 376.
- Бегларян А.А., Зулумян Н.О., Исаакян А.Р., Габриелян А.А., Терзян А.М. Исследование поведения дунитового серпентина при термоллизе. №2, с. 214.
- Белоконь Ю.Н., см. Мкртчян А.Ф. №1, с. 108.
- Варданян Л.Р., см. Айрапетян С.А. №1, с. 40.
- Варданян Л.Р. Экстракты некоторых лекарственных растений как антиоксиданты. №4, с. 486.
- Варданян Р.Л., см. Айрапетян С.А. №1, с. 40.
- Вардересян Г.Ц., см. Сиракян М.А., №1, с. 65.
- Вартанян С.О., Саргсян А.Б., Авакян А.С., Агекян А.А., Степанян Г.М., Пароникян Р.В. Синтез и изучение антибактериальных свойств новых дизамещенных производных тиомочевины. №2, с. 251.
- Ворсканян А.С., см. Амбарцумян Э.Н. №4, с. 514.
- Габриелян А.А., см. Бегларян А.А. №2, с. 214.
- Галстян А.С., см. Кочикян Т.В. №1, с. 153; №3, с. 418.
- Галстян Л.Х., Аветисян К.С., Алебян З.Г., Топузян В.О. Синтез некоторых четвертичных аммониевых солей на базе 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофура[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона и их биологическая активность. №4, с. 507.
- Гарибян О.А., Макарян Г.М., Оганнисян М.Р., Чобанян Ж.А. Синтез компонента феромона хищного паука *emboasca vitis-evarcha-albaria*-(Е)-2,6-диметиллокта-3,7-диен-2,6-диола. №3, с. 413.
- Гаспарян Н.К., см. Сиракян М.А. №1, с. 65.
- Гаспарян С.П., см. Геворкян К.А. №2, с. 259.
- Геворкян К.А., Арутюнян А.Д., Арутюнян Г.Л., Пароникян Р.В., Степанян Г.М., Паносян Г.А., Гаспарян С.П. Синтез и изучение антибактериальной активности 2-хинолин-1,3-диазаадамантанов, содержащих пиперидиновую или морфолиновую группу во втором положении хинолинового ядра. №2, с. 259.
- Геолчанян А.В., см. Мкртчян А.Ф. №1, с. 108.
- Григорян А.А., см. Амбарцумян Э.Н. №4, с. 514.
- Григорян А.С., см. Григорян Н.П. №4, с. 523.

- Григорян Г.Л., Бегларян А.А., Арутюнян А.Б., Петросян А.О., Саргсян М.П., Григорян К.М. Нанесение наночастиц CuO на твердые носители химическим транспортом и их антибактериальная активность. №3, с. 376.
- Григорян Дж.Д., Апоян С.А., Чобанян Ж.Н., Мелик-Оганджян Л.Г. Изучение физико-химических свойств этанольного раствора лецитина в присутствии диметилсульфоксида. №4, с. 480.
- Григорян К.М., см. Григорян Г.Л. №3, с. 376.
- Григорян Н.П., Григорян А.С., Пароникян Р.Г., Сукасян Р.С. Синтез, превращения 4'-амино-1'H-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамиды и изучение биологических свойств. №4, с. 523.
- Григорян Н.Ю., см. Дадаян С.А. №1, с. 71, 137.
- Григорян Н.Ю. Асимметрический синтез (S)-2-метил-2-амино-3-(4'-хлорбензоилфенил)пропионовой кислоты. №3, с. 393.
- Григорян С.Л., см. Малхасян Р.Т. №2, с. 308.
- Гукасян Г.Т. Синтез (Z)-4-(4-(4,6-дифеноксид-1,3,5-триазин-2-илокси) бензилиден)-2-фенилоксазол-5(4H)-она. №3, с. 398.
- Гукасян П.С. Влияние светового излучения холоднопламенных вспышек на реакцию холоднопламенного окисления циклогексана. №2, с. 207.
- Гюлумян Э.А., см. Дангян Ю.М. №1, с. 89.
- Давтян А.Г., Асатрян Р.С., Арсентьев С.Д., Мантаян А.А. Изучение поверхности потенциальной энергии взаимодействия атома кислорода с этиленом. №3, с. 358.
- Давтян А.Г., Асатрян Р.С., Арсентьев С.Д., Мантаян А.А. Энергетические пути образования оксида этилена, ацетальдегида и винилового спирта на поверхности потенциальной энергии взаимодействия гидроксильного радикала с этиленом. №3, с. 367.
- Давтян Д.С., см. Тоноян А.О. №2, с. 285.
- Давтян С.П., см. Тоноян А.О. №2, с. 285.
- Дадаян А.С., см. Дадаян С.А. №1, с. 71, 137.
- Дадаян С.А., Григорян Н.Ю., Дадаян А.С., Погосян А.С., Сагиян А.С., Амбарцумян А.А. Конструирование и стереоселективный синтез новых производных 2-аминопропионовых кислот. №1, с. 71.
- Дадаян С.А., Григорян Н.Ю., Мангасарян С.Г., Дадаян А.С., Сагиян А.С. Исследование бромсодержащих модифицированных  $Ni^{II}$ -комплексов основания Шиффа аминокислот в асимметрических реакциях C-алкилирования. №1, с. 137.
- Данагулян А.Г., см. Данагулян Г.Г. №2, с. 233, 275.
- Данагулян Г.Г., Туманян А.К., Данагулян А.Г., Аттарян О.С. Рециклизации солей пиримидиния в реакциях с гидрамидами N-замещенных пирозолилкарбоновых кислот. №2, с. 233.
- Данагулян Г.Г., Туманян А.К., Киноян Ф.С., Данагулян А.Г. Синтез бис-гетероарильных систем пиримидина и пиразола, а также комплексов меди (II) на их основе. №2, с. 275.

- Дангян В.Т., см. Дангян Ю.М. №1, с. 89.
- Дангян Ю.М., Саргсян Т.О., Дангян В.Т., Джамгарян С.М., Гюлумян Э.А., Паносян Г.А., Цатурян А.О., Сагиян А.С. Синтез пептидов, содержащих (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'- и 4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланины и выявление их возможных биологических свойств. №1, с. 89.
- Дарбинян Г.Г., Алексанян М.С., Хачатрян А.Г. Потенциометрическое и амперометрическое определение золота(III) и платины(IV) аллил- и фенилтиомочевинами. №2, с. 226.
- Джамгарян С.М., см. Дангян Ю.М., №1, с. 89.
- Дунамалян Л.А., Аветисян А.Г., Чатилян А.А., Харатян С.Л. Кинетические закономерности восстановления трехокиси вольфрама водородом. №3, с. 347.
- Егиян К.И., см. Агаджанян А.Е. №4, с. 532.
- Енгоян А.П., см. Амбарцумян Э.Н. №4, с. 514.
- Зулумян Н.О., см. Бегларян А.А. №2, с. 214.
- Ирадян М.А., Ирадян Н.С., Паносян Г.А. Нитрование 2-(4-алкоксифенил)имидазо[1,2-а]пиридинов. №1, с. 148.
- Ирадян Н.С., см. Ирадян М.А. №1, с. 148.
- Исаакян А.Р., см. Бегларян А.А. №2, с. 214.
- Кабалян Ю.К., см. Малхасян Р.Т. №2, с. 308.
- Саркисян С.С. №3, с. 426.
- Казарян А.А. Исследование богатой  $\text{TeO}_2$  области диаграммы состояния бинарной системы  $\text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{TeO}_2$ . №4, с. 552.
- Карапетян А.Ж., см. Мкртчян А.Ф. №3, с. 403.
- Кетян А.Г., см. Тоноян А.О. №2, с. 285.
- Киноян Ф.С., см. Айцоян С.С. №2, с. 266.
- Киракосян А.В., см. Айдинян С.В. №2, с. 196.
- Конькова С.Г., см. Айцоян С.С. №2, с. 266.
- Котикян С.Ю., см. Сиракян М.А. №1, с. 65.
- Кочикян А.Т., см. Кочикян Т.В. №1, с. 153.
- Кочикян В.Т., см. Цатурян А.О. №3, с. 385.
- Кочикян Л.Р. Новый, простой и точный ВЭЖХ-УФ метод количественного определения колхицина в плазме человека. №4, с. 496.
- Кочикян Т.В., Самвелян М.А., Галстян А.С., Арутюнян В.С., Франгян В.Р., Кочикян А.Т., Никитина Л.Е. Конденсация 4,5-дизамещенных-1Н-1,2,4-триазол-3-тиолов с метилакрилатом и акрилонитрилом. №1, с. 153.
- Кочикян Т.В., Самвелян М.А., Галстян А.С., Мазулевский В.М., Ненайденко В.Г. Синтез и исследование пинаколиновой перегруппировки диололактонов нового строения. №3, с. 418.
- Куртикян Т.С. Спектральные исследования взаимодействия оксидов азота с гем-моделями. №4, с. 455.
- Мазулевский В.М., см. Кочикян Т.В. №3, с. 418.

- Макарян Г.М., см. Гарибян О.А. №3, с. 413.
- Малеев В.М., см. Мкртчян А.Ф. №1, с. 108.
- Малхасян Н.Р., см. Малхасян Р.Т. №2, с. 308.
- Малхасян Р.Т., Кабалян Ю.К., Григорян С.Л., Малхасян Н.Р. Сравнительное исследование влияния наноразмерных аморфных и кристаллических добавок  $\text{MoO}_2$  на адгезионные свойства различных полимерных нанокомпозитов. №2, с. 308.
- Мангасарян С.Г., см. Дадаян С.А. №1, с. 137.
- Манташян А.А., см. Давтян А.Г. №3, с. 358, 367.
- Манташян А.А. IV Научная конференция Армянского химического общества. №1, с. 159.
- Манташян А.А., Неркаряян К.Г. Кинетический анализ процесса окислительного превращения метана в метанол в неизотермических условиях в двухсекционном реакторе. Моделирование и эксперимент. №1, с. 20.
- Манукян З.О., см. Тавадян Л.А. №3, с. 339.
- Манукян З.О., Арутюнян Л.А., Мусаелян М.В., Мкрян Г.Г., Тавадян Л.А. Антирадикальная активность селенофена, тиофена и их производных. №2, с. 183.
- Мардяян З.З., см. Мкртчян А.Ф. №3, с. 403.
- Цатурян А.О. №3, с. 385.
- Маркарян Р.Э., см. Арустамян Ж.С. №1, с. 99.
- Мелик-Оганджянян Л.Г., см. Григорян Дж.Д. №4, с. 480.
- Минасян Н.С., см. Арустамян Ж.С. №1, с. 99.
- Мирзоян Л.А., см. Айрин Э.Х. №1, с. 57.
- Мкртчян А.Ф., Геолчанян А.В., Симонян А.М., Петросян С.Г., Сагиян А.С., Малеев В.И., Белоконь Ю.Н., Хрусталева В.Н. Синтез положительно заряженных комплексов  $\text{Co}^{\text{III}}$  и их исследование в качестве хиральных катализаторов в реакциях асимметрического генерирования C-C связи. №1, с. 108.
- Мкртчян А.Ф., Мардяян З.З., Карапетян А.Ж., Погосян А.С., Петросян С.Г., Симонян А.М., Цатурян А.О., Сагиян А.С. Асимметрический синтез новых энантиомерно обогащенных ненасыщенных  $\alpha$ -аминокислот. №3, с. 403.
- Мкрян Г.Г., см. Манукян З.О. №2, с. 183.
- Тавадян Л.А. №3, с. 339.
- Мнацаканян В.А., см. Ананикян Г.С. №1, с. 51.
- Муражян Р.Е., см. Арустамян Ж.С. №1, с. 99.
- Мусаелян М.В., см. Манукян З.О. №2, с. 183.
- Ненайденко В.Г., см. Кочикян Т.В. №3, с. 418.
- Неркаряян К.Г., см. Манташян А.А. №1, с. 20.
- Ниязян О.М., см. Айдинян С.В. №2, с. 196.
- Никитина Л.Е., см. Кочикян Т.В. №1, с. 153.
- Оганисян Г.Ж., см. Агаджанян А.Е. №4, с. 532.

- Оганнисян М.Р., см. Гарибян О.А. №3, с. 413.
- Оганян Н.А., см. Айриян Э.Х. №1, с. 57.
- Паносян Г.А., см. Ананикян Г.С. №1, с. 51.  
Геворкян К.А. №2, с. 259.  
Дангян Ю.М., №1, с. 89.  
Ирадян М.А. №1, с. 148.
- Пароникян Р.В., см. Вартамян С.О. №2, с. 251.  
Геворкян К.А. №2, с. 259.
- Пароникян Р.Г., см. Григорян Н.П. №4, с. 523.
- Петросян А.О., см. Григорян Г.Л. №3, с. 376.
- Петросян С.Г., см. Мкртчян А.Ф. №1, с. 108; №3, с. 403.
- Погосян А.С., см. Дадамян С.А. №1, с. 71.  
Мкртчян А.Ф. №3, с. 403.
- Погосян М.Дж., см. Погосян Н.М. №1, с. 11.
- Погосян Н.М., Погосян М.Дж., Арсентьев С.Д., Тавадян Л.А., Арутюнов В.С. Влияние температуры на процесс окислительного крекинга пропана. №1, с. 11.
- Саакян А.Д., см. Тавадян Л.А. №3, с. 339.
- Сагиян А.С., см. Агаджанян А.Е. №4, с. 532.  
Дадамян С.А. №1, с. 71, 137.  
Дангян Ю.М., №1, с. 89.  
Мкртчян А.Ф. №1, с. 108; №3, с. 403.  
Цатурян А.О. №3, с. 385.
- Самвелян М.А., см. Кочикян Т.В. №1, с. 153; №3, с. 418.
- Саргсян А.Б., см. Вартамян С.О. №2, с. 251.
- Саргсян М.П., см. Григорян Г.Л. №3, с. 376.
- Саргсян М.С., см. Айцоян С.С. №2, с. 266.
- Саргсян Т.О., см. Дангян Ю.М. №1, с. 89.
- Саркисян С.С., Кабалаян Ю.К. Влияние перекиси дикумила на релаксационные свойства полиэтиленов высокого и низкого давлений. №3, с. 426.
- Симонян А.М., см. Мкртчян А.Ф. №1, с. 108; №3, с. 403.
- Сираканян М.А., Вардересян Г.Ц., Котикян С.Ю., Торосян А.Т., Гаспарян Н.К. Сорбция ионов свинца и кадмия из водных растворов композиционными сорбентами. №1, с. 65.
- Степанян Г.М., см. Геворкян К.А. №2, с. 259.  
Вартамян С.О. №2, с. 251.
- Сукасян Р.С., см. Григорян Н.П. №4, с. 523.
- Тавадян Л.А., см. Манукян З.О. №2, с. 183.  
Погосян Н.М. №1, с. 11.
- Тавадян Л.А., Манукян З.О., Саакян А.Д., Арутюнян Л.А., Мкрян Г.Г. Антипероксирадикальная способность дифенилселенида, дифенилди-селенида и селено-DL-метионина. №3, с. 339.
- Терзян А.М., см. Бегларян А.А. №2, с. 214.

- Тоноян А.О., Давтян Д.С., Кетян А.Г., Давтян С.П. Влияние геометрии реактора на закономерности фронтальной полимеризации. №2, с. 285.
- Топузян В.О., см. Галстян Л.Х. №4, с. 507.
- Топузян В.О., Алебян З.Г. Синтез и антихолинэстеразная активность диалкиламиноалкиламидов N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидровалил- $\alpha,\beta$ -дегидрофенилаланинов. №1, с. 122.
- Топузян В.О., Алебян З.Г. Синтез и антихолинэстеразная активность диалкиламиноалкиламидов N-бензоил- $\alpha,\beta$ -дегидродипептидов. №1, с. 129.
- Торосян А.Т., см. Сиракян М.А. №1, с. 65.
- Туманян А.К., см. Данагулян Г.Г. №2, с. 233, 275.
- Франгян В.Р., см. Кочикян Т.В. №1, с. 153.
- Харатян С.Л., см. Айдинян С.В. №2, с. 196.
- Дунамалян Л.А. №3, с. 347.
- Хачатрян А.Г., см. Дарбинян Г.Г. №2, с. 226.
- Хачатрян А.Х., см. Айцоян С.С. №2, с. 266.
- Хрусталева В.Н., см. Мкртчян А.Ф. №1, с. 108.
- Цатурян А.О., см. Дангян Ю.М. №1, с. 89.
- Мкртчян А.Ф. №3, с. 403.
- Цатурян А.О., Кочикян В.Т., Мардян З.З., Сагиян А.С. Хиральный анализ 1,2,4-триазолсодержащих  $\beta$ -гетероциклически замещенных  $\alpha$ -аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. №3, с. 385.
- Чатилян А.А., см. Дунамалян Л.А. №3, с. 347.
- Чобанян Ж.А., см. Гарибян О.А. №3, с. 413.
- Чобанян Ж.Н., см. Григорян Дж.Д. №4, с. 480.

## ANNUAL INDEX OF AUTHORS

- Aghajanyan A.E., Hovhannisyan G.J., Yeghiyan K.I., Saghyan A.S.* Technological features in isolation and purification of various classes of bas from fermentation solutions. №4, p. 532.
- Ananikyan H.S., Mnatsakanyan V.A., Panosyan H.A., Sargsyan S.A.* Flavolignanes of milk thistle from Artsakh. №1, p. 51.
- Arustamyan Zh.S., Markaryan R.E., Aghekyan A.A., Muradyan R.E., Asatryan T.H., Minasyan N.S.* Synthesis and study of antiarhythmic activity of a number of new amides of 1-(3,4-dimethoxyphenyl) cycloalkan-1-methylamines. №1, p. 99.
- Aydingyan S.V., Kirakosyan H.V., Niazyan O.M., Kharatyan S.L.* DTA/TGA study of copper molybdate carbothermal reduction. №2, p. 196.
- Beglaryan H.A., Zulumyan N.H., Isahakyan A.R., Gabrielyan A.A., Terzyan A.M.* The investigation of the behavior of serpentine from dunite upon thermolysis. №2, p. 214.
- Dadayan S.A., Grigoryan N.Yu., Dadayan A.S., Poghosyan A.S., Saghyan A.S., Hambardzumyan A.A.* The construction and stereoselective synthesis of new derivatives of 2-aminopropionic acids. №1, p. 71.
- Dadayan S.A., Grigoryan N.Yu., Mangasaryan S.G., Dadayan A.S., Saghyan A.S.* Study of bromo-containing modified Ni<sup>II</sup>-complexes of Schiff bases of amino acids in asymmetric C-alkylation reactions. №1, p. 137.
- Danagulyan G.G., Tumanyan A.K., Danagulyan A.G., Attaryan H.S.* Recyclizations of pyrimidinium salts in the reactions with hydrazides of N-substituted pyrazolylcarboxylic acids. №2, p. 233.
- Danagulyan G.G., Tumanyan A.K., Kinoyan F.S., Danagulyan A.G.* Synthesis of bis-heteroaryl systems of pyrimidine and pyrazole as well as of copper (II) complexes based thereon. №2, p. 275.
- Danghyan Yu.M., Sargsyan T.H., Danghyan V.T., Djamgaryan S.M., Gyulumyan E.A., Panosyan H.A., Tsaturyan A.H., Saghyan A.S.* Synthesis of peptides containing (S)- $\beta$ -[4-allyl-3-(pyridin-3'- and 4'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- $\alpha$ -alanines and detection of their possible biological properties. №1, p. 89.
- Darbinyan H.H., Aleksanyan M.S., Khachatryan H.G.* Potentiometric and amperometric determination of gold (III) and platinum (IV) by means of allyl- and phenylthioureas. №2, p. 226.
- Davtyan A.H., Asatryan R.S., Arsentev S.D., Mantashyan A.A.* The energetic pathways of ethylene oxide, acetaldehyde and vinyl alcohol formation on the potential energy surface of hydroxyl radical with ethylene interaction. №3, p. 367.
- Davtyan A.H., Asatryan R.S., Arsentev, S.D., Mantashyan A.A.* The study of potential energy surface of oxygen atom interaction with ethylene. №3, p. 358.
- Dunamalyan L.A., Avetisyan A.G., Chatilyan H.A., Kharatyan S.L.* Kinetic features of tungsten (VI) oxide reduction by hydrogen. №3, p. 347.

- Galstyan L.Kh., Avetisyan K.S., Halebyan Z.G., Topuzyan V.O.* Synthesis and biological activity of some quaternary ammonium salts on the basis of 4a,8-dimethyl-3H,5H-bis-spiro[cyclohexane-4a,5-dihydroisobenzofuro [5,6-c]furan]-1,7-(3H,4H)-dione. №4, p. 507.
- Gevorkyan K.A., Harutyunyan A.D., Harutyunyan G.L., Paronikyan R.V., Stepanyan H.M., Panosyan H.A., Gasparyan S.P.* Synthesis and study of antibacterial activity of 2-quinoline-1,3-diazaadamantanes containing piperidine or morpholino group in the second position of quinoline nucleus. №2, p. 259.
- Gharibyan H.A., Makaryan G.M., Hovhannisyan M.R., Chobanyan Zh.A.* Synthesis of pheromone component of *emboasca vitis-evarcha-albaria*, (E)-2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol. №3, p. 413.
- Ghazaryan A.A.* Study of the tellurite-rich composition range in the  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ - $\text{TeO}_2$  system. №4, p. 552.
- Ghochikyan L.R.* A novel, simple and accurate high performance liquid chromatography-UV spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma. №4, p. 496.
- Ghochikyan T.V., Samvelyan M.A., Galstyan A.S., Harutyunyan V.S., Frangyan V.R., Ghochikyan A.T., Nikitina L.E.* The condensation of 4,5-disubstituted-1H-1,2,4-triazole-3-thioles with methylacrylate and acrylonitrile. №1, p. 153.
- Ghochikyan T.V., Samvelyan M.A., Galstyan A.S., Mazulevski V.M., Nenajdenko V.G.* Synthesis and study of pinacol rearrangement diololactones of new structure. №3, p. 418.
- Ghukasyan G.T.* Synthesis of (Z)-4-(4-(4,6-diphenoxy-1,3,5-triazine-2-ylxy)benzylidene)-2-phenyloxazole-5(4H)-one. №3, p. 398.
- Grigoryan G.L., Beglaryan H.A., Harutyunyan A.B., Petrosyan A.H., Sargsyan M.P., Grigoryan K.M.* Deposition of CuO nanoparticles on solid carriers by chemical transportation and their antibacterial activity. №3, p. 376.
- Grigoryan J.D., Apoyan S.A., Chobanyan J.N., Melik-Oganjanyan L.G.* Study of physico-chemical properties of the ethanol solution of lecithin in the presence of dimethyl sulfoxide. №4, p. 480.
- Grigoryan N.P., Grigoryan A.S., Paronikyan R.G., Sukasyan R.S.* The synthesis and transformations of 4'-amino-1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-naphthalene]-3'-carboxamides, study of some biological properties of the synthesized compounds. №4, p. 523.
- Grigoryan N.Yu.* The asymmetric synthesis of (S)-2-amino-3-(4'-chlorobenzoylphenyl)propionic acid. №3, p. 393.
- Gukasyan P.S.* Influence of cool-flame lights on the reaction of cool-flame cyclohexane oxidation. №2, p. 207.
- Hambardzumyan E.N., Vorskanyan A.S., Grigoryan A.A., Yengoyan A.P.* Synthesis of 5-([1,3,5]triazinylthioalkyl)-[1,3,4]-oxadiazole-3H-2-thiones derivatives. №4, p. 514.
- Harutyunyan A.A.* Synthesis of new 2,4,5,6-tetrasubstituted pyrimidines. №1, p. 81.

- Hasratyan A.A.* On the interaction of salicylaldehydes with amidoesters of malonic acid. №2, p. 244.
- Hayotsyan S.S., Hasratyan A.A., Konkova S.G., Khachatryan A.Kh., Badasyan A.E., Sargsyan M.S.* On chemoselectivity of intramolecular cyclization at interaction of araldimines and arylamides of acetoacetic acid. №2, p. 266.
- Hayrapetyan S.A., Vardanyan L.R., Vardanyan R.L.* The content and activity of antioxidants of ethylacetate extracts of the herbs growing in Goris region of Armenia. №1, p. 40.
- Hayriyan E.Kh., Mirzoyan L.A., Ohanyan N.A., Baghdasaryan L.S.* On the mechanism of the reaction of molybdophosphoric heteropoly acid with basic dye nile blue. №1, p. 57.
- Iradyan M.A., Iradyan N.S., Panosyan H.A.* Nitration of 2-(4-alkoxyphenyl) imidazo[1,2-a]pyridines. №1, p. 148.
- Kurtikyan T.S.* Spectral studies of nitrogen oxides interaction with heme models. №4, p. 455.
- Malkhasyan R.T., Kabalyan Yu.K., Grigoryan S.L., Malkhasyan N.R.* Comparative study of the effect of nanoscale and crystalline additives of  $\text{MoO}_2$  on the adhesion properties of various polymer nanocomposites. №2, p. 308.
- Mantashyan A.A.* IV Scientific Conference of the Armenian Chemical Society. №1, p. 159.
- Mantashyan A.A., Nerkararyan K.G.* Kinetic analysis of oxidative conversion of methane to methanol at non-isothermal conditions in two-sectional flow reactor. Modeling and experiment. №1, p. 20.
- Manukyan Z.O., Harutyunyan L.A., Musayelyan M.V., Mkryan G.G., Tavadyan L.A.* Antiradical ability of selenophene, thiophene and their aminocarbonitrile derivatives. №2, p. 183.
- Mkrtchyan A.F., Geolchanyan A.V., Simonyan H.M., Petrosyan S.G., Saghyan A.S., Maleev V.I., Belokon Yu.N., Khrustalev V.N.* Synthesis of positively charged  $\text{Co}^{\text{III}}$  complexes and their study as chiral catalysts in the reactions of C-C bond asymmetric generation. №1, p. 108.
- Mkrtchyan A.F., Mardiyan Z.Z., Karapetyan A.Zh., Poghosyan A.S., Petrosyan S.G., Simonyan H.M., Tsaturyan A.O., Saghyan A.S.* Asymmetric synthesis of new enantiomerically enriched unsaturated  $\alpha$ -amino acids. №3, p. 403.
- Poghosyan N.M., Poghosyan M.J., Arsentev S.D., Tavadyan L.A., Harutyunov V.S.* The temperature influence on the process of propane oxidative cracking. №1, p. 11.
- Sargsyan S.S., Kabalyan Yu.K.* The influence of dicumyl peroxide on the relaxation properties of the high and low pressure polyethylenes. №3, p. 426.
- Sirakanyan M.A., Varderesyan G.C., Kotikyan S.Yu., Torosyan A.T., Gasparyan N.K.* The sorption of cadmium and plumbum ions from aqueous solutions by composite sorbents. №1, p. 65.

- Tavadyan L.A., Manukyan Z.H., Sahakyan A.D., Harutyunyan L.H., Mkryan G.G.* Antiperoxyradical ability of diphenylselenide, diphenyldiselenide and seleno-DL-methionine. №3, p. 339.
- Tonoyan A.O., Davtyan D.S., Ketyan A.G., Davtyan S.P.* Influence of reactor geometry on the mechanism of frontal polymerization. №2, p. 285.
- Topuzyan V.O., Halebyan Z.G.* Synthesis and anticholinesterase activity of dialkylaminoalkyl amides of N-benzoyl- $\alpha,\beta$ -dehydrovalyl- $\alpha,\beta$ -dehydrophenylalanines. №1, p. 122.
- Topuzyan V.O., Halebyan Z.G.* Synthesis and anticholinesterase activity of dialkylaminoalkyl amides of N-benzoyl- $\alpha,\beta$ -dehydrodipeptides. №1, p. 129.
- Tsaturyan A.H., Kochikyan V.T., Mardiyan Z.Z., Saghyan A.S.* Chiral analysis of  $\beta$ -heterocyclic substituted 1,2,4- triazole-containing  $\alpha$ -amino acids by the method of reverse-phase HPLC. №3, p. 385.
- Vardanyan L.R.* Extracts of some herbs as antioxidants. №4, p. 486.
- Vardanyan S.O., Sargsyan A.B., Avagyan A.S., Aghekyan A.A., Stepanyan H.M., Paronikyan R.V.* Synthesis and study of antibacterial properties of new disubstituted derivatives of thiourea. №2, p. 251.

## **Вниманию авторов!**

Подробную информацию о «Химическом журнале Армении», содержание номеров журнала в графической форме и аннотации статей, годовые авторские указатели, а также развернутые правила для авторов можно получить в сети Интернет по адресу: <http://chemjournal.sci.am> и [www.flib.sci.am](http://www.flib.sci.am)

## **ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ**

### **Общие положения**

К публикации в «Химическом журнале Армении» принимаются материалы, содержащие результаты оригинальных исследований, оформленные в виде **полных статей, кратких сообщений и писем в редакцию**.

Журнал публикует работы по всем направлениям химической науки, в том числе по общей и неорганической химии, физической химии и химической физике, органической химии, металлоорганической и координационной химии, химии полимеров, химии природных соединений, биоорганической химии и химии материалов.

Статьи, предлагаемые к публикации в разделе биоорганической химии, должны быть посвящены получению новых потенциально биологически активных соединений, в том числе и выделенных из природных объектов. **При описании новых веществ, обладающих значительной (в сравнении с применяемыми в медицине лекарствами) биологической активностью**, статья может содержать результаты биологических исследований, включающие ссылки на использованные методы изучения биологической активности, информацию о типе использованных биообъектов, активности и токсичности синтезированных препаратов в сопоставлении с соответствующими показателями применяемых в медицине лекарств.

В заключении следует привести краткий аргументированный вывод о связи между структурой и биологической активностью исследованных соединений. Опубликованные материалы, а также материалы, представленные для публикации в других журналах, к рассмотрению не принимаются.

**Авторские обзоры** должны представлять собой обобщение и анализ результатов цикла работ одного или нескольких авторов по единой тематике.

**Полные статьи** принимаются объемом до 12 страниц, объем **краткого сообщения** — не более 5 страниц машинописного текста. **Письма в редакцию** должны содержать изложенные в краткой форме научные результаты принципиально важного характера, требующие срочной публикации; объем письма в редакцию — не более 3 страниц машинописного текста. Редакция оставляет за собой право сокращать статьи независимо от их объема.

**Для публикации статьи авторам необходимо представить в редакцию следующие материалы и документы:**

- 1) направление от организации (в 1 экз.);
- 2) экспертное заключение (для граждан РА) (в 1 экз.);
- 3) подписанный всеми авторами текст статьи, включая аннотацию, таблицы, рисунки и подписи к ним (все в 2-х экз.);
- 4) графический реферат (в 2-х экз.);

Статья должна быть написана сжато, аккуратно оформлена и тщательно отредактирована. Не допускается дублирование одних и тех же данных в таблицах, на схемах и рисунках.

Автор несет полную ответственность за достоверность экспериментальных данных, приводимых в статье.

Все статьи, направляемые в редакцию, подвергаются рецензированию и научному редактированию.

Статья, направленная авторам на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде **вместе с ее первоначальным вариантом** в максимально короткие сроки. К переработ-

танной рукописи необходимо приложить **письмо от авторов**, содержащее ответы на все замечания и комментарии и поясняющее все внесенные изменения. **Статья, задержанная на исправлении более двух месяцев или требующая повторной переработки, рассматривается как вновь поступившая.**

Редакция посылает автору перед набором для проверки отредактированный экземпляр статьи, корректуру, а также верстку.

### **Структура публикаций**

Публикация **обзоров, полных статей и кратких сообщений** начинается с индекса УДК, затем следуют заглавие статьи, инициалы и фамилии авторов, развернутые названия научных учреждений, полные почтовые адреса с индексами почтовых отделений, номера факсов и адреса электронной почты. Далее приводится краткая аннотация (не более 20 строк) с указанием конкретных результатов работы и вытекающих из них выводов.

В статьях **теоретического и физико-химического характера** приводятся сжатое введение в проблему и постановка задачи исследования, экспериментальная или методическая часть, обсуждение полученных результатов с **заключением**, а в статьях, **посвященных синтезу**, — общая часть (введение и задача исследования), обсуждение полученных результатов с **заключением** и экспериментальная часть. Рисунки с подрисовочными подписями и таблицы могут быть введены в текст. В **письмах в редакцию** аннотация на русском языке не приводится и разбивка на разделы не требуется; даются индекс УДК, название статьи, инициалы и фамилии авторов, название научных учреждений и их адреса, резюме на армянском и английском языках.

Графический реферат прилагается на отдельной странице (120×55 мм) и представляет собой **информативную иллюстрацию** (ключевую схему, структуру соединения, уравнение реакции, график и т.п.), отражающую суть статьи в **графическом** виде. Текст в графическом реферате допускается только в случае крайней необходимости, при этом следует избегать дублирования названия статьи и текста аннотации.

**При несоблюдении указанных выше правил статья не принимается к публикации.**

### **Пример оформления заглавия статьи, списка авторов, адресов учреждений, аннотации.**

УДК.....

### **АСИММЕТРИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ $\beta$ -ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННЫХ L- $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ**

**А. С. Сагян,<sup>a</sup> Ю. Н. Белоконь<sup>b</sup> и К. Фишер<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Ереванский государственный университет  
Армения, 0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1  
Факс: (374-10)559355 E-mail: sagysu@netsys.am

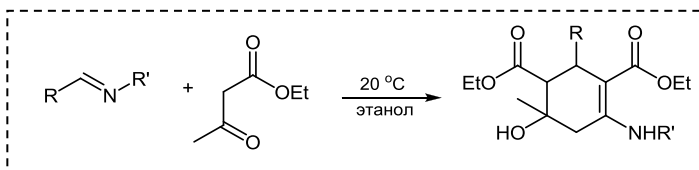
<sup>b</sup> Институт элементоорганических соединений  
им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук  
Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28  
Факс: (495) 135 6549. E-mail: yubel@ineos.ac.ru

<sup>b</sup> Институт органического катализа ИФОК Университета г. Росток  
Германия, Росток, Д-180055, Бухбиндер штрассе, 5-6  
Факс: E-mail:

Разработан новый эффективный метод асимметрического синтеза  $\beta$ -гетероциклически замещенных L- $\alpha$ -аминокислот посредством присоединения 3-амино-1,2,4-тиадиазола и 5-меркапто-1,2,4-триазолов, содержащих различные заместители в положениях 3 и 4, к C=C связи Ni(II) комплекса с основанием Шиффа дегидроаланина и (S)-2-N-(N'-бензилпропил)аминобензофенона.

О взаимодействии N-алкилиминов с ацетоуксусным эфиром

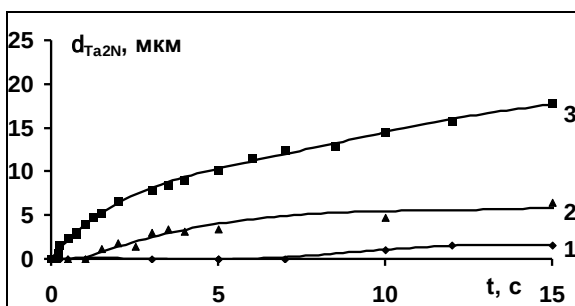
М. С. Саргсян  
С. С. Айоцян  
А. Х. Хачатрян  
А. Э. Бадасян  
С. Г. Конькова



*Хим. ж. Армении, 2011, т. 64, №4, с. 511*

Кинетика высокотемпературного азотирования тантала в изотермических условиях

Ц. А. Адамян  
Е. Н. Степанян  
А. А. Чатилян  
С. Л. Харатян



*Хим. ж. Армении, 2011, т. 64, №3, с. 316*

Оформление статей в «Химическом журнале Армении»

Текст статьи печатается **через 1,5 интервала** (без помарок и вставок) на белой бумаге стандартного размера (формат А4) с полями 3 см с левой стороны, 1,5 см с правой стороны, 2,5 см сверху, 2,5 см снизу, **размер шрифта — 12**.

Все страницы рукописи, включая список литературы и графический реферат, нумеруются.

Уравнения, схемы, таблицы, рисунки и ссылки на литературу нумеруются **в порядке их упоминания в тексте**.

**Список цитируемой литературы** должен включать ссылки на наиболее существенные работы по теме статьи. В тексте статьи должны быть упомянуты **все ссылки**, приведенные в списке литературы. В тексте **ссылки** на литературу даются в квадратных скобках и нумеруются **строго в порядке их упоминания**. Список литературы печатается на отдельной странице с указанием инициалов и фамилий **всех авторов** (не допускаются записи *и др.*, *et al.*).

**Список литературы** должен быть оформлен следующим образом:

**Книги:** Бучаченко А.Л., Вассерман А.М. Стабильные радикалы. М., Химия, 1973, 58 с.

**Статьи в сборниках:** Ола Дж., Фарук О., Пракаш Дж. К.С. в кн: Активация и каталитические реакции алканов / под ред. К.М.Хилла. М., Наука, 1992, с. 39.

**При цитировании переводных изданий** после выходных данных русскоязычной версии в квадратных скобках необходимо указать выходные данные оригинального издания. Например: *Внутреннее вращение молекул.* / под ред. В.Д.Орвилл-Томаса. М., Мир, 1974, 374 с. [Internal Rotation in Molecules, Ed. W. J. Orville-Thomas, Wiley, New York, 1974, 329 pp.].

**Журналы:** Gal'pern E.G., Stankevich I.V., Chistyakov A.L., Chernozatonskii L.A. // Chem. Phys. Lett., 1997, v.269, p. 85.

**При цитировании русскоязычного журнала, переводимого за рубежом**, необходимо приводить ссылку и на англоязычную версию. Например: Лайков Д. Н., Устынюк Ю. А. // *Изв. АН, Сер. хим.*, 2005, с.804 [Russ. Chem. Bull., Int. Ed., 2005, 54, 820].

**Патенты:** А.с. 9854 СССР // *Б.И.*, 1978, 61. или: US Pat. 55973 // *Chem. Abstrs.*, 1982, 97, 150732.

**Диссертации:** Ковалев Б.Г. Автореф. дисс. «...» доктора хим. наук. Город, институт, год, стр.

**Программы:** Sheldrick G. M., *SHELXL93, Program for the Refinement of Crystal Structure*, Göttingen University, Göttingen (Germany), 1993.

**Банки данных:** *Cambridge Structural Database System, Version 5.17*, 1999.

**Ссылки на неопубликованные результаты и частные сообщения** даются исключительно в виде сносок, а в списке литературы не приводятся и не нумеруются. При цитировании неопубликованных работ и частных сообщений необходимо представить разрешение от лица, на чьи данные приводится ссылка.

### Памятка для авторов

Для максимального **сокращения сроков публикации** редакция просит авторов обратить особое внимание на **оформление статьи**.

#### **Общие положения**

Материалы, представляемые в редакцию:

☐ фамилия, имя, отчество и координаты лица, с которым редакция должна вести переписку (почтовый адрес, номер телефона, номер факса, адрес электронной почты). Фамилия автора, ответственного за переписку, должна быть отмечена звездочкой.

☐ направление от организации

☐ экспертное заключение (для граждан РА)

☐ текст статьи, аннотации на русском, английском и армянском языках на отдельных страницах (либо в тексте), рисунки и таблицы (все в 2 экз.)

☐ графический реферат

☐ **только для кратких сообщений и писем в редакцию:** объем рукописи не должен превышать 5 и 3 страниц машинописного текста, соответственно

☐ **последовательность расположения частей статьи** (кроме писем в редакцию):

☐ индекс УДК

☐ название статьи

☐ автор(ы)

☐ развернутое название научной организации

☐ почтовый адрес с индексом

☐ факс

☐ адрес электронной почты

☐ аннотация

☐ **собственно текст статьи**

☐ введение

☐ постановка задачи

**для статей физико-химической тематики:**

☐ экспериментальная часть

☐ обсуждение полученных результатов с заключением

**для статей, посвященных синтезу:**

☐ обсуждение полученных результатов с заключением

☐ экспериментальная часть

☐ благодарности

☐ список литературы

### Требования к оформлению и подготовке рукописи

☐ **В экспериментальной части** должны быть представлены **доказательства строения и чистоты** всех новых соединений, источники использованных **нетривиальных реагентов** или **методики их получения**, а также условия **дополнительной** подготовки реагентов и растворителей.

□ Для всех синтезированных соединений следует дать **названия по номенклатуре IUPAC**. Металлоорганические комплексы могут быть названы по системе *Chemical Abstracts*.

□ Все **таблицы, схемы, рисунки, соединения и ссылки на литературу** должны нумероваться строго в порядке упоминания в тексте.

□ На осях графиков должны быть указаны **наименования и единицы измерения** соответствующих величин.

□ Рисунки спектров не должны быть выполнены от руки.

□ Все используемые **аббревиатуры и сокращения** должны соответствовать приведенному в Правилах для авторов списку или расшифровываться при первом упоминании.

□ Данные рентгеноструктурного исследования следует представлять в виде рисунка(ков) молекулы (с пронумерованными атомами) или кристаллической упаковки и таблиц, содержащих **необходимые** геометрические характеристики молекул (**основные** длины связей, валентные и торсионные углы).

□ Для основного текста статьи обязательно использование шрифта Unicode, желательно Times New Roman, для греческих букв — шрифт Symbol.

□ Текст статьи печатается **через 1,5 интервала** (без помарок и вставок) на белой бумаге стандартного размера (формат A4) с полями 3 см с левой стороны, 1,5 см с правой стороны, 2,5 см сверху, 2,5 см снизу, **размер шрифта — 12**.

□ Символы переменных физических величин (например, температура —  $T$ ), единицы их измерения (К), стереохимические дескрипторы (*цис*,  $Z$ ,  $R$ ), локанты ( $N$ -метил), буквенные (но не цифровые) символы при обозначении групп симметрии должны быть напечатаны *курсивом* ( $C2v$ , но не  $C2v$ ).

□ В тексте статьи должны быть упомянуты **все ссылки**, приведенные в списке литературы. **Ссылки** в тексте даются в квадратных скобках строго **в порядке их упоминания**.

□ В **списке литературы** должны использоваться только стандартные сокращения названий журналов.

# ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

## Ընդհանուր և ֆիզիկական քիմիա

|                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Կուրտիկյան Տ.Ս. Հեմ-մոդելների հետ ազոտի օքսիդների փոխազդեցությունը<br>սպեկտրալ ուսումնասիրությունը.....                                                                                         | 455 |
| Գրիգորյան Ջ.Դ., Ափոյան Ա.Հ., Չոբանյան Ժ.Ն., Մելիք-Օհանջանյան<br>Լ.Գ. Լեցիտինի էթանոլային լուծույթների ֆիզիկաքիմիական հատկու-<br>թյունների ուսումնասիրությունը դիմեթիլսուլֆօքսիդի ներկայությամբ. | 480 |
| Վարդանյան Լ.Ռ. Որոշ դեղաբույսերի թուրմերը որպես հակաօքսիդիչներ.....                                                                                                                             | 486 |

## Անալիտիկ քիմիա

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Ղոչիկյան Լ.Ռ. ԲԷՀՔ-ՈՒՄ եղանակով մարդու պլազմայում կոլիսիցինի<br>քանակական որոշման նոր, պարզ և ճշգրիտ մեթոդ..... | 496 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## Օրգանական և կենսաօրգանական քիմիա

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Գալստյան Լ.Խ., Ավետիսյան Կ.Ս., Հալեբյան Ջ.Ղ., Թոփուգյան Վ.Օ.<br>4a,8-Դիմեթիլ-3H,5H-բիս-սպիրո[ցիկլոհեքսան-4a,5-դիհիդրոիզոբենզո-<br>ֆուրո[5,6-c]ֆուրան]-1,7-(3H,4H)-դիոնի բազայի վրա որոշ չորրոր-<br>դային ամոնիումային աղերի սինթեզը և նրանց կենսաբանական ակտի-<br>վությունը ..... | 507 |
| Համբարձումյան Է.Ն., Վորսկանյան Ա.Ս., Գրիգորյան Ա.Ա., Ենգոյան<br>Ա.Փ. 5-([1,3,5]-Տրիագինիլթիուրակիլ)-[1,3,4]-օքսադիազոլ-3H-2-թիոն-<br>ների ածանցյալների սինթեզը .....                                                                                                              | 514 |
| Գրիգորյան Ն.Պ., Գրիգորյան Ա.Ս., Պարոնիկյան Ռ.Գ., Սուկասյան Ռ.Ս.<br>4'-Ամինո-1'H-սպիրո[ցիկլոհեքսան-1,2'-նավթալին]-3'-կարբոքսամիդի<br>սինթեզը, փոխարկումները և ստացված միացությունների որոշ կենսա-<br>բանական հատկությունների ուսումնասիրումը .....                                 | 523 |

## Քիմիական տեխնոլոգիա

|                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Աղաջանյան Ա.Ե., Հովհաննիսյան Գ.Ժ., Եղյան Կ.Ի., Սադյան Ա.Ս. Ֆեր-<br>մենտացիոն հեղուկներից տարբեր դասերի կենսաբանորեն ակտիվ նյու-<br>թերի անջատման և մաքրման տեխնոլոգիական առանձնահատկությու-<br>նները..... | 532 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## Նամակներ խմբագրությանը

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Ղազարյան Ա.Ա. Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -TeO <sub>2</sub> բինար համակարգի վիճակի դիագրամի թեկու-<br>րով հարուստ հատվածի ուսումնասիրությունը..... | 552 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| Նեղինակների և հոդվածների ցանկ..... | 557 |
|------------------------------------|-----|

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Կանոններ հեղինակների համար ..... | 568 |
|----------------------------------|-----|

## СОДЕРЖАНИЕ

### Общая и физическая химия

|                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Куртиян Т.С.</i> Спектральные исследования взаимодействия оксидов азота с гем-моделями.....                                                                              | 455 |
| <i>Григорян Дж.Д., Апоян С.А., Чобаян Ж.Н., Мелик-Оганджяна Л.Г.</i> Изучение физико-химических свойств этанольного раствора лецитина в присутствии диметилсульфоксида..... | 480 |
| <i>Вардамян Л.Р.</i> Экстракты некоторых лекарственных растений как антиоксиданты.....                                                                                      | 486 |

### Аналитическая химия

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Кочиян Л.Р.</i> Новый, простой и точный ВЭЖХ-УФ метод количественного определения колхицина в плазме человека ..... | 496 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

### Органическая и биоорганическая химия

|                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Галстян Л.Х., Аветисян К.С., Алебян З.Г., Топузян В.О.</i> Синтез некоторых четвертичных аммониевых солей на базе 4а,8-диметил-3Н,5Н-бис-спиро[циклогексан-4а,5-дигидроизобензофуоро[5,6-с]фуран]-1,7-(3Н,4Н)-диона и их биологическая активность ..... | 507 |
| <i>Амбарцумян Э.Н., Ворсканян А.С., Григорян А.А., Енгоян А.П.</i> Синтез производных 5-([1,3,5]-триазинилтиоалкил)-[1,3,4]-оксадиазол-3Н-2-тионов .....                                                                                                   | 514 |
| <i>Григорян Н.П., Григорян А.С., Пароникян Р.Г., Сукасян Р.С.</i> Синтез, превращения 4'-амино-1'Н-спиро[циклогексан-1,2'-нафталин]-3'-карбоксамиды и изучение биологических свойств .....                                                                 | 523 |

### Химическая технология

|                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Агаджанян А.Е., Оганисян Г.Ж., Егиян К.И., Сагиян А.С.</i> Технологические особенности выделения и очистки различных классов биологически активных веществ из ферментационных растворов.... | 532 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

### Письма в редакцию

|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Казарян А.А.</i> Исследование богатой $\text{TeO}_2$ области диаграммы состояния бинарной системы $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{--TeO}_2$ ..... | 552 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                |            |
|------------------------------------------------|------------|
| <b>Годовой указатель авторов и статей.....</b> | <b>557</b> |
|------------------------------------------------|------------|

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| <b>Правила для авторов .....</b> | <b>568</b> |
|----------------------------------|------------|

# CONTENTS

## General and Physical Chemistry

|                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Kurtikyan T.S.</i> Spectral studies of nitrogen oxides interaction with heme models.....                                                                                                   | 455 |
| <i>Grigoryan J.D., Apoyan S.A., Chobanyan J.N., Melik-Oganjanyan L.G.</i> Study of physico-chemical properties of the ethanol solution of lecithin in the presence of dimethylsulfoxide ..... | 480 |
| <i>Vardanyan L.R.</i> Extracts of some herbs as antioxidants.....                                                                                                                             | 486 |

## Analytic Chemistry

|                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Ghochikyan L.R.</i> A novel, simple and accurate high performance liquid chromatography-UV spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma..... | 496 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## Organic and Bioorganic Chemistry

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Galstyan L.Kh., Avetisyan K.S., Halebyan Z.G., Topuzyan V.O.</i> Synthesis and biological activity of some quaternary ammonium salts on the basis of 4a,8-dimethyl-3H,5H-bis-spiro[cyclohexane-4a,5-dihydroisobenzofuro [5,6-c]furan]-1,7-(3H,4H)-dione..... | 507 |
| <i>Hambardzumyan E.N., Vorskanyan A.S., Grigoryan A.A., Yengoyan A.P.</i> Synthesis of 5-([1,3,5]triazinylthioalkyl)-[1,3,4]-oxadiazole-3H-2-thiones derivatives .....                                                                                          | 514 |
| <i>Grigoryan N.P., Grigoryan A.S., Paronikyan R.G., Sukasyan R.S.</i> The synthesis and transformations of 4'-amino-1'H-spiro[cyclohexane-1,2'-naphthalene]-3'-carboxamides, study of some biological properties of the synthesized compounds .....             | 523 |

## Chemical Technology

|                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Aghajanyan A.E., Hovhannisyan G.J., Yeghiyan K.I., Saghyan A.S.</i> Technological features in isolation and purification of various classes of BAS from fermentation solutions ..... | 532 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## Letters to Editors

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Ghazaryan A.A.</i> Study of the tellurite-rich composition range in the Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -TeO <sub>2</sub> system..... | 552 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| <b>Annual Index of Authors .....</b> | <b>557</b> |
|--------------------------------------|------------|

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| <b>Rules for Authors .....</b> | <b>568</b> |
|--------------------------------|------------|