

На правах рукописи

Ластовой Антон Павлович

**Влияние межмолекулярных
взаимодействий на спектральные и
фотохимические свойства производных
тетраазахлорина**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре технологии химико-фармацевтических и косметических средств (ТХФиКС) Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева и в лаборатории 10 ФГУП «ГНЦ «НИОПИК».

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Авраменко Григорий Владимирович, заведующий кафедрой ТХФиКС Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор Шапиро Борис Исаакович, ведущий научный сотрудник кафедры физической химии Московского государственного университета тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова

кандидат химических наук, доцент Тифлова Людмила Александровна, доцент кафедры физической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Ивановский государственный химико-технологический университет

Защита состоится 17 июня 2014 года в _____ на заседании диссертационного совета Д 212.204.11 при РХТУ им. Д. И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в 443 ауд. (конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «___» апреля 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.11



Мурашова Н.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию агрегации порфиринов, иммобилизованных в различных матрицах, например, пленках высокомолекулярных соединений и водных растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ). В то же время, в большинстве литературных источников не рассматривается межмолекулярное взаимодействие этих матриц и порфиринов, которое играет большую роль в их агрегации. Исследование причин агрегации и способов ее предотвращения позволяет расширить границы применения порфиринов и их аналогов, а также разработать теоретическую базу для проектирования на их основе супрамолекулярных систем с заданными спектральными и фотохимическими свойствами.

Объектом исследования в настоящей работе является ряд представителей нового класса порфиразинов с sp^3 -гибридными β -положениями одного из пиррольных фрагментов тетрапиррольного макроцикла – тетраазахлоринов (ТАС). Физико-химические свойства данного класса функциональных красителей мало изучены и представляют большой интерес для раскрытия потенциала их применения в медицине и технике. Уникальные спектральные свойства, а именно наличие полос с высоким молярным коэффициентом поглощения на границе видимой и ближней инфракрасной области спектра, где собственное поглощение биологических тканей минимально (700-800 нм, «терапевтическое окно»), открывают перспективы применения ТАС в фотодинамической терапии (ФДТ).

Цель работы заключалась в выяснении влияния межмолекулярных взаимодействий на спектрально-люминесцентные, фотохимические, кислотно-основные и окислительно-восстановительные свойства ряда водонерастворимых замещенных ТАС, а также установлении общих причин, приводящих к их агрегации в различных системах, в частности в бинарных смесях полярных растворителей и мицеллярных растворах неионогенных ПАВ (НПАВ). Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выявить влияние среды и структуры молекул ТАС на их склонность к агрегации;
- установить причины агрегации ТАС, солюбилизированных в мицеллах НПАВ;
- выяснить влияние агрегации на спектрально-люминесцентные, фотохимические характеристики и кислотно-основные свойства ТАС;
- определить закономерности окислительной деструкции мономеров и агрегатов ТАС;

- разработать простой способ солюбилизации водонерастворимых замещенных ТАС в растворах неионогенных ПАВ для проверки их фотодинамической активности;
- оценить влияние степени агрегации ТАС на их фотодинамическую активность;
- выявить наиболее перспективные сенсibilизаторы из исследуемого ряда и предложить рекомендации по их практическому применению.

Научная новизна. Впервые исследованы фотохимические и кислотно-основные свойства, а также склонность к окислительной деструкции мономеров и агрегатов ряда конденсированных замещенных ТАС, синтезированных в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК». Изучены спектральные свойства их агрегатов в бинарных смесях растворителей, растворах НПАВ и кристаллическом состоянии. Предложены способы оценки мономерности, фотохимических характеристик и молярного коэффициента поглощения димеров ТАС в растворах НПАВ. Представлен ряд новых методов солюбилизации водонерастворимых порфиринов. Установлены общие причины, приводящие к агрегации ТАС в растворах НПАВ.

Практическая значимость. Полученные в работе результаты позволяют в перспективе разработать метод управляемой агрегации для создания препаратов для фототермальной сенсibilизации с использованием в качестве фотосенсibilизаторов (ФС) ТАС и других порфириноподобных соединений или же получать растворы с высоким содержанием мономерной формы для применения в ФДТ. Показано, что изучение спектрально-люминесцентных свойств гидрофобных ФС, солюбилизированных в растворах НПАВ, позволяет прогнозировать их фотодинамическую активность и перейти от *in vitro* и *in vivo* скрининга к целенаправленному исследованию только предположительно эффективных композиций гидрофобных ФС. Используя один из методов солюбилизации, рассмотренных в работе, приготовлены композиции диамидного производного хлорина e_6 и тетра-3-пиридилбактериохлорина в растворе НПАВ, которые показали высокий фотодинамический эффект. Полученные в работе данные об устойчивости к окислению некоторых ТАС открывают перспективы использования их для катализа и фотокатализа.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались и обсуждались на научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» (Москва, 2012); VIII и IX Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, 2012, 2013); первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); первой Российской конференции по медицинской химии с международным участием (Москва, 2013).

Публикации результатов. По теме диссертации опубликованы 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в сборнике «Успехи в химии и химической технологии» и тезисы 3 докладов на различных конференциях. На основе материалов работы поданы 2 заявки на получение патентов РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, включающего 160 наименований; содержит 11 таблиц, 56 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы основная цель и задачи, научная новизна и практическая значимость.

В первой главе представлен обзор литературных данных. Рассматриваются причины агрегации порфиринов и их аналогов, а также способы ее предотвращения путем введения периферических и аксиальных заместителей в макроцикл или добавлением диспергаторов. Приводится подробное объяснение влияния агрегации на спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства порфириноподобных соединений с точки зрения теории молекулярных экситонов. Обсуждаются перспективы применения мономерных и агрегированных форм аналогов порфиринов в медицине и технике.

Во второй главе приведены характеристики исследуемых ТАС¹, солубилизаторов и других реагентов. Объектами исследования является ряд $\beta,\beta,\beta',\beta'$ -тетраметилпроизводных ТАС (рис. 1): -трибензотетраазахлорин (H_2TB^tTAC); -три(4-трет-бутилбензо)тетраазахлорин (H_2TB^tTAC); -три(3-фенилсульфанилбензо)тетраазахлорин ($H_2(3PhS)_3TB^tTAC$); -три(1,2-нафто)тетраазахлорин ($H_2-1,2-NfTAC$); -7,8,12,13,17,18-гексафенилтетраазахлорин (H_2TACPh_6).

Электронные спектры поглощения (ЭСП) регистрировали на спектрофотометре Hewlett Packard HP 8453, спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Гидродинамические радиусы молекулярных ансамблей (далее для краткости – мицелл) НПАВ определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) на спектрометре

¹ Автор выражает благодарность сотрудникам лаб. 3-1 ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»: вед. н. с., к. х. н. Макаровой Е.А. и н. с., к. х. н. Дудкину С.В. за предоставленные образцы ТАС; зав. лаб., д. х. н., проф. Лукьянцу Е.А. за помощь в организации исследований и полезную дискуссию.

Photocor Complex, оснащенном He-Ne-лазером (632,8 нм). Фотохимические исследования проводили на лабораторной установке со светодиодным источником излучения (LED) с максимумом полосы излучения 754 нм и полушириной ~28 нм, мощность которого варьировалась.

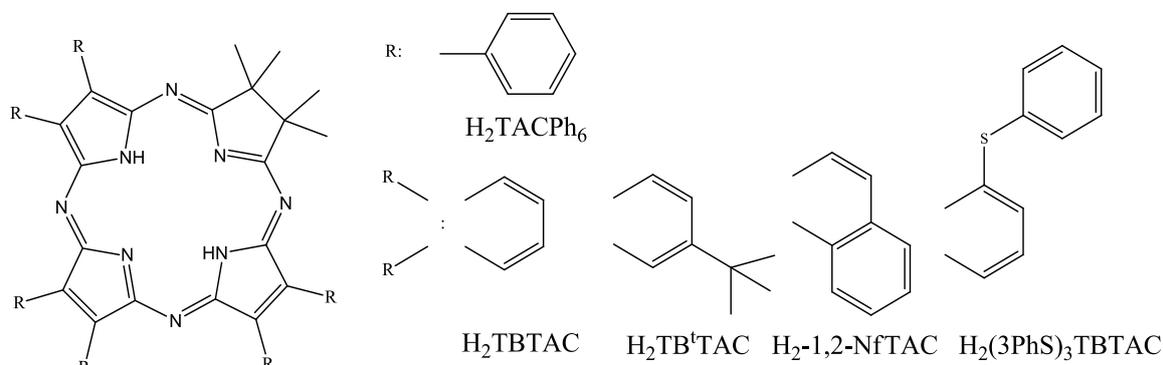


Рис. 1 – Структурные формулы исследуемых ТАС.

Описаны методики определения спектральных, фотохимических, кислотно-основных свойств и биологической активности исследуемых систем и их склонности к окислительной деструкции. Предложены различные способы солюбилизации ТАС в растворах НП АВ.

В третьей главе изложены результаты исследования и проводится их обсуждение.

Изучение специфической сольватации ТАС в смесях растворителей

ТАС обладают хорошей растворимостью в таких неполярных растворителях, как бензол, толуол, хлорбензол, пиридин, хлорметаны, ТГФ, что обусловлено наличием в их молекуле двух пар геминальных метильных заместителей в β -положениях, что существенно затрудняет π - π -взаимодействие между макроциклами ТАС, и ограниченной растворимостью в ДМСО, спиртах, ацетонитриле и алифатических углеводородах. Все ТАС в бензоле находятся в форме мономера в широком интервале концентраций (до $5,65 \cdot 10^{-5}$ М для $H_2-1,2-NfTAC$, до $1,15 \cdot 10^{-4}$ М для других ТАС).

В электронных спектрах поглощения (ЭСП) ТАС в бензоле (рис. 2а) отмечается присутствие нескольких интенсивных полос, обусловленных π - π^* переходами. Длинноволновая Q-полоса представлена в виде дублета (Q_1 с колебательными спутниками в области 700-800 нм и Q_2 в области 550-650 нм), что связано с несимметричностью молекулы тетраазахлорина, вызванной гидрированием одного из пиррольных фрагментов. При переходе к бинарным растворителям ДМСО(C_2H_5OH)– H_2O форма ЭСП ТАС меняется (рис. 2б). Наблюдаемые изменения характерны для процесса образования H-агрегатов (*face-to-face*). В смеси ДМСО– H_2O для $H_2(3PhS)_3TB^tTAC$ и для всех ТАС в смеси протонодонорных растворителей C_2H_5OH – H_2O с увеличением объемной доли воды максимум длинно-

волновой компоненты Q -полосы батохромно сдвигается на величину до 11 нм относительно полосы Q_I в спектре ТАС в ДМСО или C_2H_5OH (табл. 1), что говорит о специфической сольватации при агрегации ТАС с образованием слабой водородной связи с мезо-атомами азота и третичными атомами азота координационного центра.

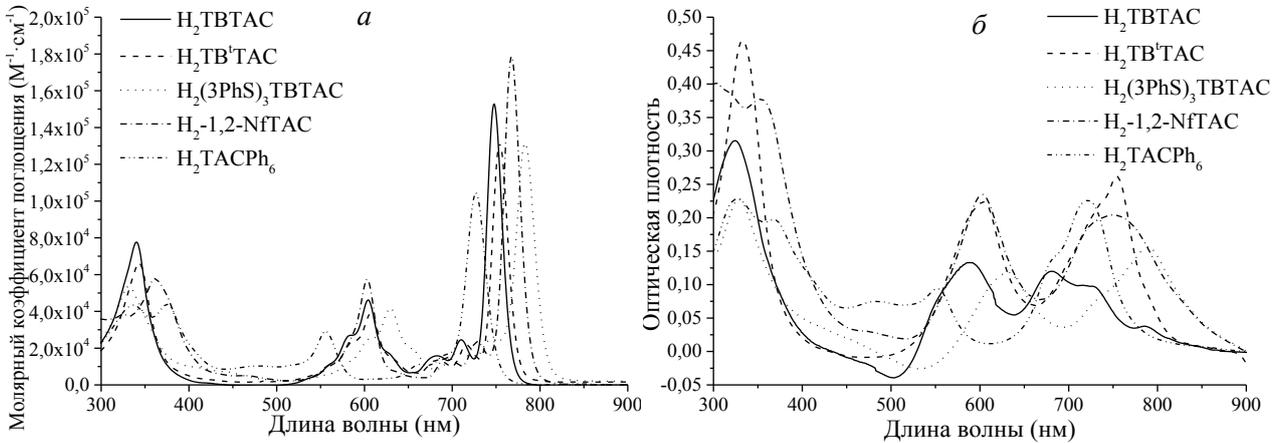


Рис. 2 – ЭСП мономеров ТАС в C_6H_6 (а) и их агрегатов в бинарных смесях ДМСО(C_2H_5OH)– H_2O (б).

Таблица 1.

Спектральные характеристики полосы Q_I ТАС в смесях растворителей.

Соединение	Состав бинарной смеси ДМСО– H_2O		λ_{max} , нм	ϵ_{max} , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	Состав бинарной смеси C_2H_5OH – H_2O	
	λ_{max} , нм	ϵ_{max} , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$			λ_{max} , нм	ϵ_{max} , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$
$H_2ТВТАС$	5:0	747	-	5:0	743	-
	3:2	746	-	1:4	753	-
$H_2ТВᵗТАС$	5:0	753	80400	5:0	750	122300
	4:1	755	17600	3:2	753	30400
$H_2(3PhS)_3ТВТАС$	5:0	782	75000	5:0	779	18400
	3:2	791	25100	3:2	790	4300
$H_2-1,2-NfТАС$	5:0	765	69700	5:0	760	-
	4:1	764	12300	3:2	-	-
$H_2ТАСPh_6$	5:0	723	50900	5:0	739	-
	1:4	721	16100	3:2	740	-

Изучение изменения количества мономера $H_2ТВТАС$ в бензоле при добавлении метанола и ацетонитрила (рис. 3) показало, что $H_2ТВТАС$ формирует равновесные системы смешанного состава (мономер, димер, агрегаты высокого порядка). Область значений диэлектрической проницаемости от 10 до 22 для бинарной смеси C_6H_6 – CH_3OH и от 10 до 28 для C_6H_6 – CH_3CN соответствует области существования димера; при более высоких значениях $H_2ТВТАС$ находится преимущественно в форме *face-to-face* агрегата высокого порядка. При одинаковой диэлектрической проницаемости $H_2ТВТАС$

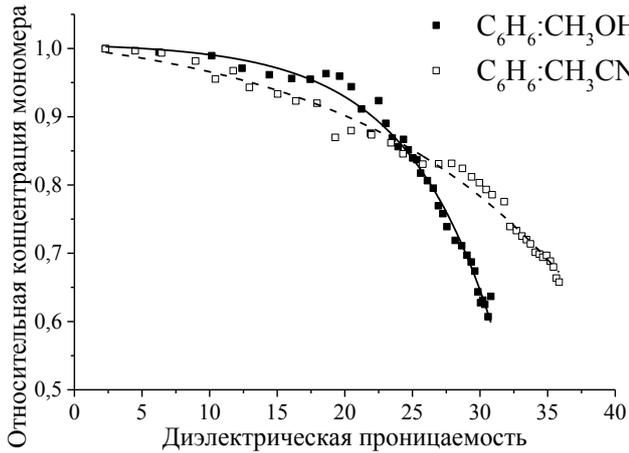


Рис. 3 – Зависимость относительной концентрации мономера от диэлектрической проницаемости бинарного растворителя.

имеет более высокую степень агрегации в смесях с протодонорным метанолом.

Кислотно-основные свойства мономеров и агрегатов ТАС

Спектрофотометрическое титрование растворов мономерной формы ТАС в бензоле трифторуксусной кислотой приводит к образованию монопротонированной формы (табл. 2). Результаты протонирования NiТВТАС свидетельствуют о локализации протона при монопротонировании по *мезо*-атому азота.

Таблица 2.

Изменение спектральных характеристик полосы Q_1 при образовании первой протонированной формы ТАС и константы монопротонирования.

Соединение	λ_{\max} (ТАС), нм	ε_{\max} (ТАС), $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$\Delta\nu_{\max}$ (ТАСН ⁺), cm^{-1}	$\Delta\varepsilon_{\max}$ (ТАСН ⁺), $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	n	$lg K_p$	Коэф-т корреляции
H ₂ ТВТАС	748	152900	-466	-70500	2,66	4,45	0,9997
H ₂ ТВ ^t ТАС	754	132000	-459	-58200	2,38	4,77	0,9995
H ₂ (3PhS) ₃ ТВТАС	782	131600	-869	-53100	2,57	4,04	0,9977
H ₂ -1,2-NfТАС	767	178400	-662	-56800	2,52	3,40	0,9997
H ₂ ТАСPh ₆	727	105200	-475	-39500	3,27	3,68	0,9989

Сравнение констант протонирования позволило расположить ТАС в ряд по уменьшению основных свойств: H₂ТВ^tТАС > H₂ТВТАС > H₂(3PhS)₃ТВТАС > H₂ТАСPh₆ > H₂-1,2-NfТАС. Количество присоединенных молекул кислоты n равное 2 означает, что протонированный комплекс стабилизируется за счет гомосопряжения аниона CF₃COO⁻ с молекулой CF₃COOH и образования комплексного аниона. Дробное же значение n свидетельствует, по видимому, о побочных реакциях, протекающих с участием CF₃COOH, что связано с деструкцией ТАС при протонировании и наиболее заметно для H₂ТАСPh₆, где значение $n > 3$.

При использовании в качестве растворителя и протонирующего агента концентрированной H₂SO₄ была получена четвертая протонированная форма ТАС (рис. 4). Для H₂(3PhS)₃ТВТАС, H₂-1,2-NfТАС и H₂ТАСPh₆ наблюдается агрегация их четвертой

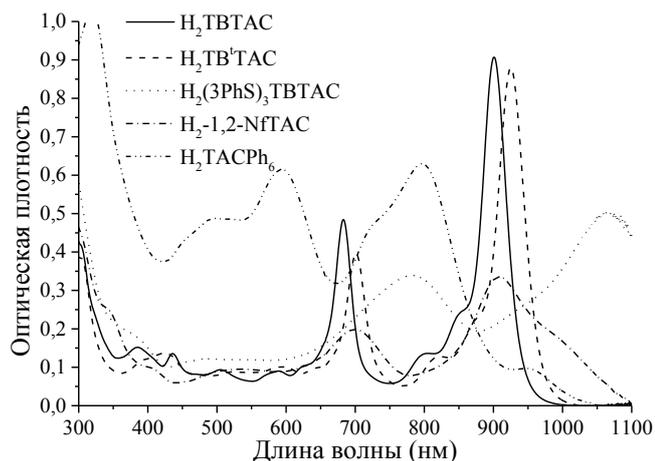


Рис. 4 – ЭСП ТАС в концентрированной H_2SO_4 .

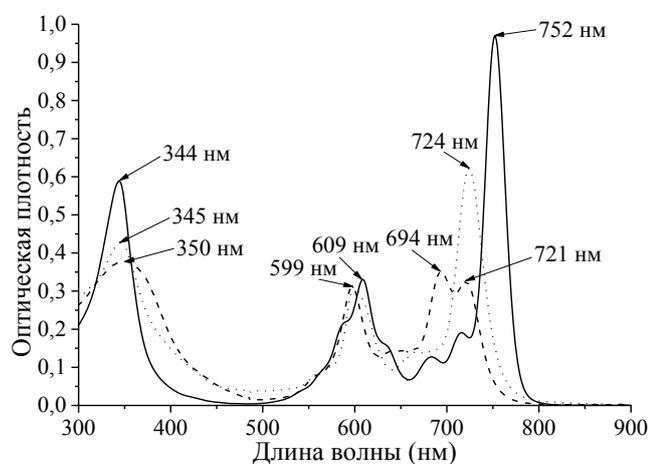


Рис. 5 – ЭСП депротонированных форм H_2TB^+TAC .

(рис. 5). Кроме того, при депротонировании были зарегистрированы спектры, отличающиеся расщеплением полосы Q_1 на две компоненты при сохранении формы полосы Q_2 (рис. 5), что, вероятно, соответствует переходу моноаниона в дианион.

Взаимодействие агрегатов ТАС в системе бинарных растворителей ДМСО– H_2O с $NaOH/KOH$ во всех случаях, за исключением H_2TACPh_6 , приводит к образованию дианиона мономерной формы. Изучение взаимодействия агрегатов ТАС, полученных в бинарных смесях ДМСО– H_2O и $C_2H_5OH-H_2O$, с H_2SO_4 показало их низкую склонность к протонированию, что обусловлено плотной упаковкой молекул ТАС.

Агрегация ТАС, солюбилизированных в растворах НП АВ

Сравнение способов солюбилизации ТАС в НП АВ на примере Cremophor EL (CrEL) проводилось посредством оценки мономерности и степени солюбилизации. Мономерность оценивалась путем сравнения молярного коэффициента поглощения (ϵ) ТАС в максимуме полосы Q_1 в бензоле и растворе НП АВ или по данным флуоресцентных измерений.

протонированной формы. Батохромный сдвиг полосы Q_1 $H_2(3PhS)_3TBTAC$ более чем на 200 нм при тетрапротонировании связан, по-видимому, с дополнительным протонированием S-атома фенилтиофрагмента. Все ТАС оказались чрезвычайно нестабильными в концентрированной H_2SO_4 .

При титровании раствором $H^+[AlBr_4]^-$ в $C_6H_5NO_2$ для ряда ТАС идентифицированы вторая и третья протонированные формы, причем для $H_2(3PhS)_3TBTAC$ и $H_2-1,2-NfTAC$ детектировали только их агрегаты. H_2TACPh_6 при взаимодействии с $H^+[AlBr_4]^-$ подвергается чрезвычайно быстрой деструкции.

Взаимодействие ТАС с неорганическими ($NaOH/KOH$) и органическими (тетрабутиламмония гидроксид) основаниями приводит к образованию дианионов

При приготовлении растворов по методу «в расплаве» ТАС растворялись в расплаве НПАВ, который затем гидратировался. В этом случае на степень мономерности и солубилизации основное влияние оказывает температура расплава (оптимально 65-70°C). При солубилизации по методу «в пленке» ТАС и НПАВ растворялись в органическом растворителе (бензол, толуол), который затем выпаривался, а образовавшаяся пленка гидратировалась. Использование данного метода привело к увеличению степени солубилизации ТАС до 100% во всех случаях и молярного коэффициента поглощения в максимуме полосы Q_I в 1,1-2,1 раза по сравнению с результатами, полученными «в расплаве» (табл. 3). Важной особенностью метода «в пленке» является то, что на стадии приготовления растворов ТАС находятся в мономерном состоянии.

Таблица 3.

Сравнение способов солубилизации $1,12 \cdot 10^{-4}$ М ТАС в 4% CrEL.

Соединение	$\epsilon_{\max} Q_I$ в бензоле, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	«В расплаве» CrEL		«В пленке» CrEL
		$\epsilon_{\max} Q_I$, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	Степень солубилизации, %	$\epsilon_{\max} Q_I$, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$
H ₂ TBTAC	152900	71180	73,3	96550
H ₂ TB ^t TAC	132000	79220	100	115530
H ₂ (3PhS) ₃ TBTAC	131600	81780	100	91480
H ₂ -1,2-NfTAC	178400	42480	68,4	44330
H ₂ TACPh ₆	105200	41810	53,1	88970

Форма ЭСП всех ТАС, кроме H₂-1,2-NfTAC, в растворе 4% CrEL обладает практически полным сходством с формой спектров мономеров данных ТАС в бензоле. Отмечается незначительное уширение основания полосы Q_I (особенно заметно для H₂TBTAC на рис. 6а), что связано с частичной агрегацией этих ТАС, которая подтверждается меньшей интенсивностью флуоресценции ТАС в CrEL по сравнению растворами в бензоле (рис. 6б).

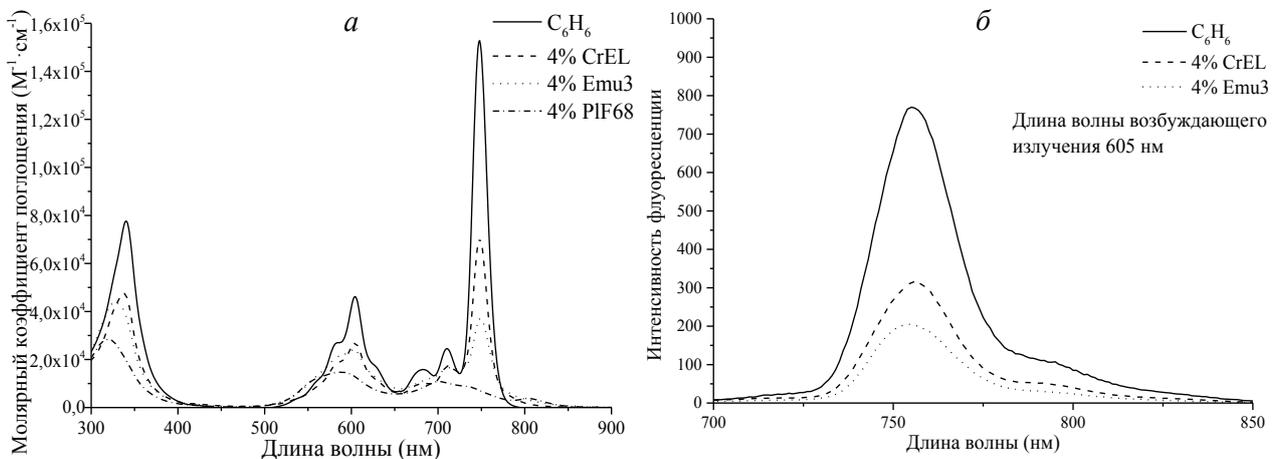


Рис. 6 – ЭСП (а) и спектры флуоресценции (б) H₂TBTAC в 4%-ных растворах различных НПАВ.

В ЭСП ТАС, солюбилизированных в растворах 4% Эмукола 3 (Emu3), наблюдается уширение основания полосы Q_1 , размытие ее колебательных спутников и существенное уменьшение интенсивности. H_2 -1,2-NfTAC во всех рассматриваемых растворах НПАВ сильно агрегирован.

Форма ЭСП всех ТАС в 4% Pluronic F-68 (PIF68), а также практически полное отсутствие флуоресценции свидетельствует об образовании *face-to-face* агрегатов. В ЭСП агрегата H_2 TACPh₆ в PIF68 наблюдается заметный гипсохромный сдвиг максимумов всех полос поглощения относительно спектра мономера в бензоле. Агрегация H_2 -1,2-NfTAC и H_2 ТВТАС (рис. 6а) сопровождается появлением новой полосы при 824 и 802 нм, соответственно, что объясняется увеличением плотности упаковки макроциклов и переходом в состояние, близкое к кристаллическому, и описывается с точки зрения теории СТ-экситона. Спектры *face-to-face* агрегатов в целом аналогичны спектрам, полученным в смесях растворителей (рис. 1б).

Спектры ТАС в конденсированном состоянии, полученные путем кристаллизации из толуола и гептана на пластинке KBr, имеют форму, характерную для *face-to-face* агрегатов высокого порядка в бинарных смесях растворителей или растворах PIF68, что подтверждает предположение о переходе ТАС в кристаллическое состояние при агрегации в этих средах. Отсутствие объемистых периферических заместителей в H_2 ТВТАС и H_2 -1,2-NfTAC вызывает некоторые различия в спектрах при кристаллизации из гептана и толуола, что может быть связано с полиморфизмом полученных кристаллов.

Исследование спектральных свойств H_2 ТВТАС ($5,74 \cdot 10^{-5}$ М), солюбилизированного в 0,04 М растворах различных НПАВ, показало влияние структуры НПАВ на процесс агрегации. Было отмечено, что чем длиннее неполярный фрагмент молекулы НПАВ и чем больше объем гидрофобного ядра (например, у CrEL), тем лучшей способностью к мономеризации солюбилизата он обладает. Попарное сравнение НПАВ с одинаковой структурой, но разным гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ), выявило отсутствие корреляции степени агрегации H_2 ТВТАС с численным значением ГЛБ. H_2 ТВТАС в растворах PIF68 (ГЛБ 29), Pluronic PE6400 (PIPE6400, ГЛБ 13,4) и Lutrol F127 (LuF127, ГЛБ 18-23) имеет абсолютно одинаковые ЭСП, соответствующие спектрам агрегата. При сравнении спектров H_2 ТВТАС в НПАВ с одинаковым ГЛБ, но разной структурой (Lutensol XP80 и АО11, ГЛБ 14), оказалось, что H_2 ТВТАС агрегирован в XP80 практически полностью, а в АО11 лишь частично.

Если длина гидрофильного фрагмента молекулы НПАВ слишком мала (Lutensol АО7 и ТО10), то мицелла не способна удерживать H_2 ТВТАС от агрегации. НПАВ с большей гидрофильной частью (PIF68, PIPE6400, LuF127, Emu) склонны к сильной гидрата-

ции, что приводит к проникновению воды в ядро мицелл и вызывает агрегацию $H_2TBTCAC$. Высокая липофильность макромолекулы (например, CrEL) обеспечивает хорошее экранирование $H_2TBTCAC$ от взаимодействий с водой. Периферические заместители в $H_2TBTCAC$, $H_2(3PhS)_3TBTCAC$ и H_2TACPh_6 препятствуют взаимодействию по π - π -типу, что увеличивает их степень мономерности по сравнению с $H_2TBTCAC$ и $H_2-1,2-NfTAC$ (табл. 3 и 4).

При увеличении соотношения НПAB/TAC возрастает степень мономерности солюбилизата. В частности, при солюбилизации одного и того же количества ФС в растворах с разной концентрацией CrEL с ростом его концентрации отмечается увеличение интенсивности спектров поглощения TAC (табл. 4).

Таблица 4.

Оценка мономерности TAC в растворах с разной концентрацией CrEL.

Соединение	Концентрация TAC, М	ϵ_{max} ПОЛОСЫ Q_I , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$				Степень мономерности TAC в 4% CrEL, %
		Бензол	1% CrEL	4% CrEL	10% CrEL	
$H_2TBTCAC$	$1,91 \cdot 10^{-4}$	152900	20800	70600	84300	42
$H_2TBTCAC$	$1,45 \cdot 10^{-4}$	132000	85300	97200	119600	68
$H_2(3PhS)_3TBTCAC$	$1,18 \cdot 10^{-4}$	131600	67800	78800	96300	35
$H_2-1,2-NfTAC$	$1,49 \cdot 10^{-4}$	178400	28000	42300	55100	16
H_2TACPh_6	$1,21 \cdot 10^{-4}$	105200	12900	82300	96000	85

Также было замечено, что полной или частичной диссоциации агрегатов TAC в CrEL, Etn и PIF68 можно добиться добавлением некоторого количества НПAB, в растворах которого TAC обычно находятся преимущественно в мономерной форме (например, CrEL). Наблюдаемая дезагрегация свидетельствует о динамичности исследуемых систем. На явлении диссоциации агрегатов TAC при увеличении соотношения НПAB/TAC основан метод определения ϵ димера, представленный в работе на примере $H_2TBTCAC$. Вычисленный ϵ димера составил $29600 \pm 3500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, а константа димеризации $H_2TBTCAC$ в 4% CrEL 2840 ± 120 л/моль ($\lg K_d = 3,45$).

Измерение среднечисленного гидродинамического радиуса мицелл Tween 80¹ (Tw80) с солюбилизированными TAC методом динамического светорассеивания после агрегации TAC, вызванной нагреванием растворов до температуры помутнения, показало изменение профиля распределения мицелл по размерам и общее увеличение их размеров после агрегации (рис. 7), что подтверждает связь динамичности мицеллярных систем с агрегацией TAC.

¹ Автор благодарит н. с. лаб. лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН, к. ф.-м. н. Рябову А.В. за помощь в проведении исследования мицеллярных систем методом ФКС.

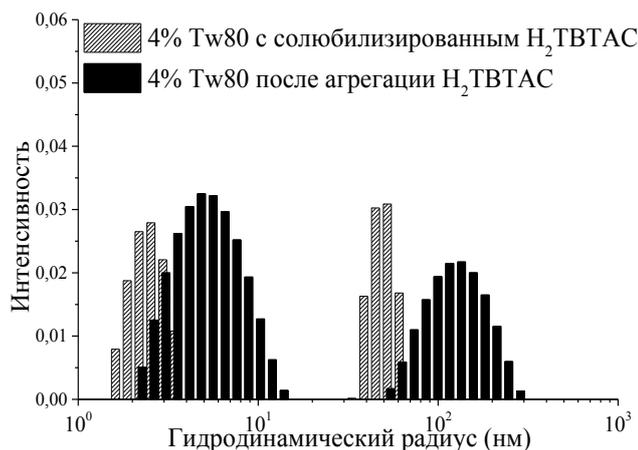


Рис. 7 – Распределение мицелл Tw80 по размерам до и после агрегации H_2TBtAC , солюбилизированного в них.

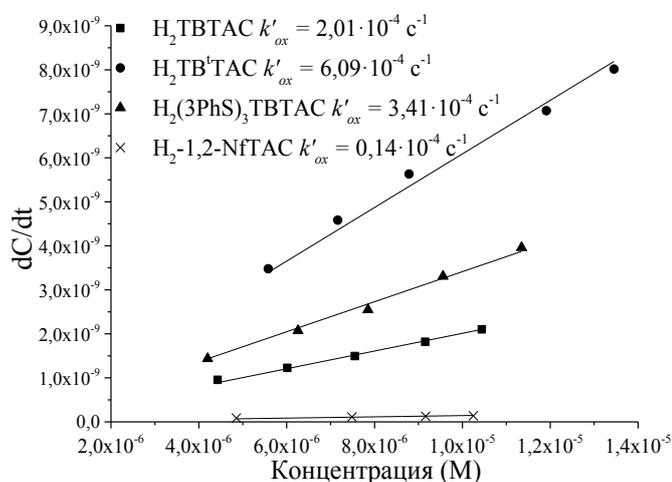


Рис. 8 – Скорость окисления ТАС как функция концентрации.

Скорость окислительной деструкции агрегатов H_2TBtAC и $H_2(3PhS)_3TBtAC$ в PIF68 сравнима с скоростью деструкции их мономеров в CrEL. Скорость окисления агрегатов H_2TBtAC в PIF68 оказалась значительно ниже скорости окисления его мономеров, что, вероятно, связано со стерическими препятствиями для взаимодействия с окислителем из-за плотной упаковки макроциклов H_2TBtAC в агрегате.

Исследование фотохимических свойств ТАС в бензоле и растворах НПАВ¹

Невысокие значения квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ_Δ) для всех ТАС за исключением H_2TACPh_6 и квантового выхода флуоресценции (Φ_f) (табл. 5) свидетельствуют о существовании альтернативных безызлучательных путей дезактивации возбужденного состояния для большинства исследованных ТАС. Значение Φ_Δ H_2TACPh_6 (0,70) коррелирует с Φ_Δ близкого ему

Устойчивость мономеров и агрегатов ТАС к окислительной деструкции

Окислительная деструкция мономеров ТАС моделировалась при их взаимодействии с перекисью бензоила. Анализ зависимости скорости окисления от начальной концентрации ТАС (рис. 8) позволил выстроить ТАС в ряд по их стабильности: $H_2TACPh_6 \gg H_2-1,2-NfTAC > H_2TBtAC > H_2(3PhS)_3TBtAC > H_2TBtAC$. H_2TACPh_6 показал аномальную устойчивость к окислению даже при взаимодействии с 0,01 М перекисью бензоила в течение 18 часов.

Взаимодействие мономеров H_2TBtAC , $H_2(3PhS)_3TBtAC$, H_2TBtAC в 2,67% CrEL при комнатной температуре с 0,01 М раствором $K_2S_2O_8$ выявило незначительное окисление этих ТАС. На примере H_2TBtAC было показано, что уменьшение количества мицеллярной фазы в 10 раз (до 0,267% CrEL) практически не ускоряет окисление.

¹ Автор благодарит руководителя научной части Долгопрудненской площадки ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», д. х. н. Кузнецову Н.А. за полезную дискуссию.

по строению хлорина $e_6(0,61)$. Наибольшим квантовым выходом фотодеструкции (Φ_p) в бензоле обладает H_2TB^tTAC , тогда как H_2TACPh_6 имеет самую высокую устойчивость к фотодеструкции (табл. 5). Безызлучательная дезактивация синглетного возбужденного состояния путем внутренней конверсии усиливается для аннелированных производных TAC по сравнению с H_2TACPh_6 .

Для установления механизма фотодеструкции TAC изучали их фотообесцвечивание в растворителях с разным временем жизни 1O_2 (например, в $C_6H_6 - \tau = 3,0 \cdot 10^{-5}$ с, в $C_5H_5N - \tau = 1,6 \cdot 10^{-5}$ с и в $C_6D_6 - \tau = 6,8 \cdot 10^{-4}$ с) и при добавлении в раствор ингибиторов 1O_2 .

Таблица 5.

Фотохимические характеристики TAC в бензоле.

Соединение	Φ_f^1	$\lambda_{max,f}$, нм	Стоксов сдвиг, cm^{-1}	Φ_Δ	Φ_{IC}	$\Phi_p, \times 10^5$
H_2TB^tTAC	0,160	755	124	0,28	0,56	1,69
H_2TB^tTAC	0,180	763	156	0,23	0,59	2,98
$H_2(3PhS)_3TB^tTAC$	0,110	794	176	0,21	0,68	0,73
$H_2-1,2-N^tTAC$	0,135	777	168	0,35	0,51	0,03
H_2TACPh_6	0,080	742	278	0,70	0,22	<0,02

Сравнение кинетических кривых фотодеструкции TAC в C_6H_6 и C_6D_6 показало увеличение скорости фотообесцвечивания для H_2TB^tTAC и H_2TB^tTAC в 1,7 раза при переходе к C_6D_6 ; для $H_2(3PhS)_3TB^tTAC$ значительного изменения кинетики в дейтерированном растворителе не наблюдалось. Замена бензола на пиридин привела к существенному (почти на порядок) ускорению фотодеструкции для всех TAC, что, вероятно, связано с изменением механизма фотообесцвечивания на свободнорадикальный. Изучение кинетики фотодеструкции H_2TB^tTAC , H_2TB^tTAC и $H_2(3PhS)_3TB^tTAC$ в присутствии 10^{-3} М 1,4-диазабицикло-[2,2,2]-октана также показало лишь частичное уменьшение скорости фотообесцвечивания. Таким образом, прямое окисление хромофора кислородом не является единственным путем фотодеградаци, а обнаруженные радикальные механизмы могут быть рассмотрены как наиболее вероятный путь фотодеструкции для TAC. При этом вклад 1O_2 в фотодеструкцию TAC определяется структурой субстрата.

Определение фотохимических свойств TAC в растворах НПАВ осложняется сильным рассеиванием света в данных системах, поэтому полученные результаты являются относительными. Было установлено, что природа НПАВ не влияет на эффективность ге-

¹ Автор выражает благодарность ст. н. с. лаб. 3-1 ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», к. х. н. Сливке Л.К. за помощь в определении Φ_f .

нерации $^1\text{O}_2$. Поэтому оценка фотостабильности и Φ_{Δ} ТАС проводилась в коллоидных растворах НП АВ (5% и 10% CrEL), где все ТАС мономерны при концентрации 10^{-6} М.

Результаты исследования генерации $^1\text{O}_2$ ТАС в 5% CrEL с применением гидрофобной ловушки 1,3-дифенилизобензофурана (DPBF) и гидрофильной α,α' -(антрацен-9,10-диил)бис(метилмалоната) тетранатриевой соли (ADMA) удовлетворительно согласуются с относительными значениями Φ_{Δ} в бензоле (табл. 6). При увеличении концентрации НП АВ в растворе скорость окисления DPBF замедляется из-за увеличения рассеивания возбуждающего излучения и появлении новых путей дезактивации $^1\text{O}_2$.

В опытах по определению Φ_{Δ} агрегатов и мономеров ТАС с ADMA (табл. 6) установлено, что наименьшей способностью к генерации $^1\text{O}_2$ обладают агрегаты $\text{H}_2\text{TB}^{\text{t}}\text{TAC}$ и $\text{H}_2(3\text{PhS})_3\text{TB}\text{TAC}$, для которых отмечается уменьшение относительного Φ_{Δ} по сравнению с мономерами в 50 и 74 раза соответственно; для агрегатов $\text{H}_2\text{TB}\text{TAC}$ в 10,4 раза, а для $\text{H}_2\text{-1,2-NfTAC}$ в 13,9. Агрегация H_2TACPh_6 привела к уменьшению относительного Φ_{Δ} всего лишь в 3,3 раза.

Таблица 6.

Относительный Φ_{Δ} ТАС в бензоле и растворах НП АВ.

Соединение	Бензол	5% CrEL с DPBF	5% CrEL с ADMA	4% PIF68 с ADMA
$\text{H}_2\text{TB}\text{TAC}$	1,22	1,28	1,25	0,12
$\text{H}_2\text{TB}^{\text{t}}\text{TAC}$	1,00	1,00	1,00	0,02
$\text{H}_2(3\text{PhS})_3\text{TB}\text{TAC}$	0,91	0,72	0,74	0,01
$\text{H}_2\text{-1,2-NfTAC}$	1,52	2,48	2,22	0,16
H_2TACPh_6	3,04	8,29	11,00	3,39

При переходе от бензола к растворам НП АВ, несмотря на рассеивание света, уменьшение растворимости кислорода и времени жизни $^1\text{O}_2$ на порядок, происходит заметное падение фотостабильности ТАС, что, по-видимому, объясняется изменением механизма фотодеструкции в мицеллярных растворах НП АВ в присутствии полярного растворителя.

Биологические испытания перспективного фотосенсибилизатора $\text{H}_2\text{TB}\text{TAC}^1$

Накопление $\text{H}_2\text{TB}\text{TAC}$ в клетках A549 исследовали при добавлении в инкубационную среду его растворов в 10% CrEL, 10% Tw80, 4% Emu3 и 4% PIF68. $\text{H}_2\text{TB}\text{TAC}$ проникает в цитоплазму клеток A549, слабо диффузно окрашивает ее и интенсивно концентрируется в гранулярных структурах. Накопление мономерной флуоресцирующей формы $\text{H}_2\text{TB}\text{TAC}$ из растворов в

¹ Автор благодарит сотрудников лаб. оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН: зав. лаб., д. б. н., доц. Феофанова А.В. и м. н. с. Игнатову А.А.; сотрудников НИМБЦ № 11 при ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»: зав., к. б. н. Иванову-Радкевич В.И. и м. н. с. Мачинскую Е.А.

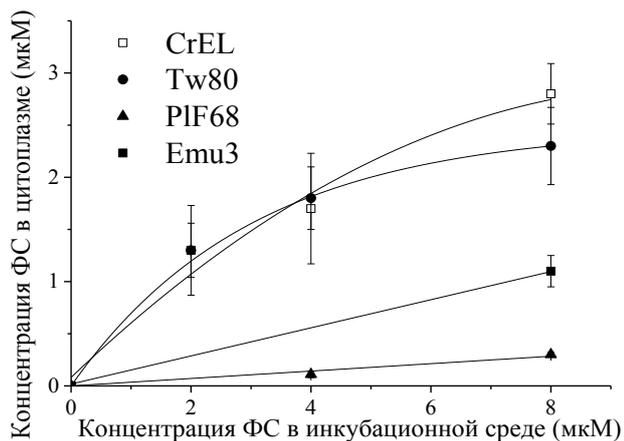


Рис. 9 – Зависимость средней концентрации H_2TBAC в цитоплазме клеток A549 от концентрации в инкубационной среде (инкубация 2 ч).

CrEL и Tw80 практически не отличается и значительно превосходит накопление из раствора в PIF68, что коррелирует с содержанием мономерной формы H_2TBAC в исходных растворах НПAB (рис. 9). Таким образом, агрегаты H_2TBAC либо не способны проникать через мембрану клеток, либо не диссоциируют в цитоплазме. Очевидно, что содержание мономерной формы H_2TBAC в растворах НПAB будет определять уровень фотоиндуцированной цитотоксичности данного ФС. Насыщение внутриклеточного накопления наступает через 2 ч инкубации клеток с раствором H_2TBAC . Установлено, что цитотоксичность Tw80 в 5 раз больше, чем у CrEL, что делает использование композиции H_2TBAC в 10% CrEL предпочтительным.

При изучении фотодинамической активности H_2TBAC в 10% CrEL установлено, что при внутривенном введении данной композиции животным в дозе 1,2 мг/кг и дальнейшем сеансе облучения через 2 ч после введения с суммарной дозой облучения 300 Дж/см² отмечается биологически значимое торможение роста опухоли (60-67%) на всем протяжении наблюдения за животными. Внутривенное введение экспериментальных образцов в отсутствие облучения не вызывает подавления роста опухолевого очага. Облучение несенсибилизированных опухолей в используемом для проведения ФДТ режиме также не приводило к уменьшению скорости роста опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние межмолекулярных взаимодействий на спектральные и фотохимические свойства триаренозамещенных тетраазахлоринов и их аналогов в бинарных смесях растворителей и растворах неионогенных ПАВ. Установлено, что исследованные тетраазахлорины склонны к *face-to-face* агрегации в данных системах.

2. Выбран наиболее эффективный способ солубилизации производных тетраазахлорина. Установлено, что использование Cremophor EL в качестве солубилизатора позволяет добиться наиболее высокой степени солубилизации и мономерности тетраазахлоринов в водно-мицеллярных растворах неионогенных ПАВ.

3. На основании данных о спектрально-люминесцентных свойствах и светорассеянии водно-мицеллярных растворов с солубилизированными тетраазахлоринами показано, что динамичность исследуемых гетерогенных систем является одним из факторов, приводящих к агрегации солубилизированных фотосенсибилизаторов. Установлено, что с увеличением соотношения ПАВ/тетраазахлорин, ростом длины неполярного фрагмента молекулы неионогенного ПАВ и увеличением объема гидрофобного ядра мицеллы возрастает степень мономерности и замедляется агрегация солубилизированных тетраазахлоринов.

4. Исследованы кислотно-основные свойства мономеров и агрегатов тетраазахлоринов; определены константы протонирования. Наиболее основным по мезо-атому азота оказался $\beta, \beta, \beta', \beta'$ -тетраметилтри(4-трет-бутилбензо)тетраазахлорин. Показано, что агрегаты протонируются заметно сложнее, чем мономеры, в то время как депротонирование агрегатов во всех случаях, за исключением 2,2,3,3-тетраметил-7,8,12,13,17,18-гексафенилтетраазахлорина, приводит к образованию дианиона мономерной формы.

5. Изучена склонность производных тетраазахлорина к окислительной деструкции; определены константы скорости окисления в реакции тетраазахлоринов с перекисью бензоила. Установлено, что 2,2,3,3-тетраметил-7,8,12,13,17,18-гексафенилтетраазахлорин обладает исключительной устойчивостью к окислению при взаимодействии с перекисью бензоила. Агрегаты тетраазахлоринов в растворах НПAB в большинстве случаев склонны к окислению наравне с мономерами, за исключением $\beta, \beta, \beta', \beta'$ -тетраметилтрибензотетраазахлорина, плотная упаковка макроциклов в агрегатах которого замедляет окислительную деструкцию.

6. Исследованы фотохимические свойства тетраазахлоринов в бензоле и растворах НПAB. Установлено, что 2,2,3,3-тетраметил-7,8,12,13,17,18-гексафенилтетраазахлорин, обладающий наибольшей устойчивостью к фотообесцвечиванию ($\Phi_p < 2 \cdot 10^{-7}$) и квантовым выходом генерации 1O_2 ($\Phi_\Delta = 0,7$), но низким квантовым выходом флуоресценции ($\Phi_f = 0,08$) в бензоле, способен генерировать 1O_2 даже в виде *face-to-face* агрегатов. Для аннелированных производных тетраазахлорина усиливается безызлучательная дезактивация синглетного возбужденного состояния. Обнаруженные радикальные механизмы рассматриваются как наиболее вероятный путь фотодеградации для тетраазахлоринов.

7. Проведена оценка фотодинамической активности композиции $\beta, \beta, \beta', \beta'$ -тетраметилтрибензотетраазахлорина в 10% растворе Cremophor EL в опытах *in vivo*, которая показала значительное и достоверное торможение роста опухоли (60-67%).

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Исследование ассоциации тетраметилтрибензотетраазахлорина в бинарных смесях полярных растворителей и в коллоидных растворах НПAB // Макрогетероциклы. 2013. Т. 6. №. 1. С. 98-105.

2. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Спектрально-люминесцентные свойства замещенных тетраазахлоринов, солюбилизированных в растворах поверхностно-активных веществ // Макрогетероциклы. 2013. Т. 6. № 2. С. 137-143.
3. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Солюбилизация водонерастворимых замещенных тетраазахлоринов в водных растворах неионогенного ПАВ Cremophor EL // Химическая технология. 2014. №. 1. С. 16-24.
4. Негримовский В.М., Макарова Е.А., Михаленко С.А. Соловьева Л.И., Южакова О.А., Донягина В.Ф., Волков К.А., Комиссаров А.Н., Шевченко Е.Н., Дудкин С.В., Березина А.П., Ластовой А.П., Лукьянец Е.А. Поиск новых синтетических фотосенсибилизаторов // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. общ. Им. Д.И. Менделеева). 2013. Т. 57. № 2. С. 31-54.
5. Ластовой А.П., Игнатова А.А., Феофанов А.В., Мачинская Е.А., Иванова-Радкевич В.И. Исследование свойств нового фотосенсибилизатора $\beta,\beta,\beta'\beta'$ -тетраметилтрибензотетраазахлорина // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. №2. С. 7-12.
6. Ластовой А.П., Авраменко Г.В., Лукьянец Е.А. Ассоциация тетраметилтрибензотетраазахлорина в водных растворах неионогенных ПАВ. Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. / М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2012. Т. XXVI. № 2. С. 27-31.
7. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Полуэмпирический метод определения молярного коэффициента поглощения димера тетраметилтрибензотетраазахлорина и констант его димеризации в бинарных смесях растворителей. Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. / М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2013. Т. XXVII. № 2. С. 21-29.
8. Ластовой А.П., Авраменко Г.В., Лукьянец Е.А. Исследование солюбилизации и агрегации тетраметилтрибензотетраазахлорина в водных растворах неионогенных ПАВ. Новые химико-фармацевтические технологии: сб. науч. тр. / М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2012. № 184. С. 215-217.
9. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Сравнение способов солюбилизации конденсированных замещенных тетраазахлоринов в растворах неионогенного ПАВ Cremophor EL. Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств»: тез. докладов / М.: ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 2013. С. 58.
10. Ластовой А.П., Игнатова А.А., Мачинская Е.А., Авраменко Г.В. Фотодинамическая активность тетраметилтрибензотетраазахлорина. Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia): тез. докладов / М.: РАН, 2013. С. 227.

Заказ № 24

Объем 0,92 п.л.

Тираж 100 экз.

Издательский центр РХТУ им. Д.И. Менделеева