

1. Введение Гиперразветвленные полимеры на основе 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой кислоты в последнее время активно используются в биомедицинских технологиях [1-3]. Известны примеры модификации структуры данного класса полимеров природными ДНК или РНК, нуклеиновыми основаниями или их искусственными аналогами. Положительный результат подобной модификации позиционирует гиперразветвленные полиэфирополиолы как перспективные объекты для целей медицинской химии. При этом сложность и многофункциональность гиперразветвленных макромолекул приводит к затруднениям в отработке синтетических методик и идентификации полученных производных. Решением данной проблемы может стать синтез и изучение структуры модельных систем на основе 2,2-ди(гидроксиметил)пропионовой кислоты. С этой целью в работе впервые синтезированы аминоксодержащие производные 2,2-ди(гидроксиметил)пропионовой кислоты, на их основе получены металлокомплексы с ионами Cu(II), Co(II), Ni(II), определена фунгицидная активность.

2. Экспериментальная часть В работе использовали 2,2-дигидроксиметилпропионовую кислоту (DMPA) (Across, 99%); соли квалификации «ч.д.а.» Cu(NO₃)₂·3H₂O, Co(NO₃)₂·6H₂O, Ni(NO₃)₂·6H₂O. Растворители и промышленные реактивы абсолютировали по стандартным методикам. Для спектрофотометрических измерений использовали раствор LiClO₄ в ДМСО (0.1 моль/л). ИК-спектры поглощения регистрировались на Фурье-спектрометре Spectrum 400 (Perkin Elmer) с приставкой НВПО алмаз-KRS-5: разрешение 1 см⁻¹, диапазон съёмки 4000-400 см⁻¹. Спектры ЯМР в (D)₂O, CDCl₃, ДМСО-d₆ были записаны на многофункциональном спектрометре ЯМР с Фурье-преобразованием "Avance 400" (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц на ядрах ¹H и 125.77 МГц на ядрах ¹³C. Электронные спектры поглощения снимали на спектрофотометре Lambda 750 (Perkin Elmer, UK) в области длин волн 190-900 нм при T=25±0.01 °C.

Синтез метилового эфира 2,2-дигидроксиметилпропионовой кислоты (соединение 2). В трехгорлой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, термометром и капельной воронкой в токе сухого аргона растворили 50 г DMPA в 300 мл метанола. При перемешивании и охлаждении (0 °C) прикапывали 64 г тионилхлорида (мольное соотношение 1:1.5) в течение 2 часов. Затем реакционную смесь перемешивали при нагревании (62 °C) в течение 6 часов. После охлаждения из реакционной смеси удалили большую часть растворителя отгонкой на вакууме. Продукт очищали путём вакуумной перегонки, T_{кип.} = 104 °C/0.2 мм рт. ст. Выход составил 75%. ЯМР ¹H (CDCl₃, δ, м.д., J, Гц): 1.04 (с, CH₃, 3H); 3.51 (с, OH, 2H); 3.64 (д, CH₂OH, J_{HH} = 11.2 Гц, 2H); 3.70 (с, OCH₃, 3H); 3.8 (д, CH₂OH, J_{HH} = 11.2 Гц, 2H). ЯМР ¹³C, (CDCl₃, δ, м.д., J, Гц): 17.78 (CH₃); 49.91 (C(C(O)OCH₃)); 51.4 (CH₃O); 66.7 (CH₂OH); 176.3 (C=O). ИК спектр (ν, см⁻¹): 3418.6 (ОНсвяз); 1712.5 (C=O); 1030 (C-O-C). Найдено, %: С 48.64; Н 8.16. С₆H₁₂O₄. Вычислено, %: С 48.64; Н 8.16. Синтез диакрилатного

производного метилпропионата (соединение 3). В трехгорлой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, капельной воронкой и термометром, растворили 5г соединения (2) в 20 мл дихлорметана. Затем добавили 5г триэтиламина и 0.056г гидрохинона. При перемешивании и охлаждении (00С) прикапывали раствор 5г хлорангидрида акриловой кислоты в 10 мл дихлорметана. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 7 часов в атмосфере сухого аргона. По окончании реакции растворитель удаляли на вакууме, полученный продукт очищали от исходных и побочных продуктов промыванием этилацетатом. Раствор продукта (3) в этилацетате сушили на вакууме (выход 60%). Соединение (3) представляет собой масло светло-желтого цвета. ЯМР ^1H , (CDCl_3 , δ , м.д., J, Гц): 1.23 (с, CH_3); 3.66 (с, CH_3O , 3H); 4.25 (д, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$, $3J_{\text{HH}}=12$ Гц, 2H); 4.28 (д, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$, $3J_{\text{HH}}=12$ Гц, 2H); 5.8 (д, $\text{CH}=\text{CH}$, $2J_{\text{HH}}=1,2$ Гц, $3J_{\text{HH}}=10,4$ Гц, 1H); 6.05 (к, $\text{CH}=\text{CH}$, $3J_{\text{HH}} = 10,4$ Гц, 1H); 6.31 (д, $\text{CH}=\text{CH}$, $2J_{\text{HH}} = 1,2$ Гц, 1H). ЯМР ^{13}C , (CDCl_3 , δ , м.д., J, Гц): 16.80 (CH_3); 45.38 ($\text{C}(\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-)_2$); 51.38 ($\text{CH}_3\text{-O}$); 64.48 (CH_2); 126.84 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 130.45 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 172.18 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$); 164.56 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}=\text{CH}_2$). ИК спектр, (ν , см $^{-1}$): 2986-2955 ср. $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1725 о.с. $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1635 ср. $\nu(\text{C}=\text{C})$; 1469, 1436 ср $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1260 с. $\nu_{\text{эфир}}(\text{C-O})$; 1139 (O-C). Найдено, %: С 48.64; Н 8.16. $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6$. Вычислено, %: С 56.25; Н 6.29. Синтез диэтиламинопроизводного метилпропионата, соединение (4). В круглодонной колбе растворили 3 г соединения (3) в 13 мл дихлорметана, затем добавили 3г диэтиламина. Перемешивание вели 7 часов при комнатной температуре, в ходе реакции раствор окрасился в темно-коричневый цвет. По окончании реакцию смесь сушили от растворителя на вакууме. Остаток переосадили в петролейном эфире. Фильтрат светло-коричневого цвета сушили на вакууме. Выход продукта (4) составил 62%. ЯМР ^1H , δ , м.д., (J, Гц): 0,95 т ($-\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$); 1.18 с ($\text{OC}(\text{O})\text{CCH}_3$); 2.45 к ($-\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$); 2.71 т ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$); 3.64 с ($\text{CH}_3\text{-O-}$); 4.17 с ($\text{CCH}_2\text{-O}$). ИК спектр, ν , см $^{-1}$): 2969-2810 ср $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1736 о. с $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1466, 1374 сл $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1295-1244 с, 1135 ср (C-O-C). Синтез металлокомплексов (соединения 4а, 4б). Навески 0.24г и 0.28г соединения (3) растворили каждую в 2 мл ацетона, добавили растворы 0.29г $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ и 0.41г $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в 2 мл ацетона (мольное соотношение соединение (3):неорганическая соль - 1:2). Смеси перемешали при комнатной температуре. Образовавшиеся комплексы выпали в осадок, продукты очистили переосаждением в петролейном эфире. Полученные металлокомплексы (4а зеленого цвета, 4б - фиолетового цвета) сушили на вакууме. ИК спектр (4а), ν , см $^{-1}$: 3422 $\nu(\text{O-H})$; 2990-2888 ср $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1735, 1709 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1476, 1364 $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1281, 1123 ср $\nu(\text{C-O-C})$. ИК спектр (4б), ν , см $^{-1}$: 3444.27 $\nu(\text{O-H})$; 2989-2812 ср $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1733 ср $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1470, 1401 $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1283, 1190 ср $\nu(\text{C-O-C})$. Расчет констант устойчивости и состава комплексных форм в растворе (метод насыщения или сдвига равновесия) Методом спектрофотометрии изучали зависимость поглощения

раствора А от c_L/c_M (где c_L и c_M - концентрации в моль/л реагента L и компонента M соответственно) при постоянной концентрации лиганда [4]. Точка излома на кривой насыщения отвечает отношению стехиометрических коэффициентов, которое равно отношению концентраций реагирующих компонентов в точке эквивалентности. Если состав комплекса M_mL_n , то искомые стехиометрические коэффициенты n или m определяли из отношения кажущихся молярных коэффициентов светопоглощения [5,6]: $\epsilon' = \frac{\epsilon_k}{n}$, где ϵ и ϵ' - кажущиеся молярные коэффициенты светопоглощения при постоянных c_M и c_L соответственно; c_M и c_L - концентрации компонента M и реагента L, моль/л; $A_{пр}$ и $A'_{пр}$ - предельные значения оптических плотностей для компонента M и реагента L соответственно. Молярный коэффициент светопоглощения (ϵ_k) образующегося комплекса рассчитывали по данным кривой насыщения, используя следующее уравнение: $\epsilon_k = \frac{\Delta A}{c_L \cdot l}$, где n - стехиометрический коэффициент; c_L - концентрация реагента L, отвечающая предельному значению оптической плотности ΔA при постоянной концентрации c_M , моль/л; l - толщина кюветы. Концентрацию комплексной формы $ск$ находили из выражения: $ск = \frac{\epsilon_k \cdot c_L}{\epsilon_M + \epsilon_L}$, где ϵ_k , ϵ_M , ϵ_L - молярные коэффициенты светопоглощения образующегося комплекса компонента M и реагента L. На основании полученных данных рассчитывали условную константу устойчивости образующегося комплекса β'_n : $\beta'_n = \frac{ск^n}{c_M^m \cdot c_L^n}$. Рассчитанные графическим способом константы устойчивости использовались при формировании матрицы стехиометрии в математическом моделировании процессов комплексообразования по программе CPESSP [7].

Определение фунгицидной активности Для проведения биоиспытаний на противогрибковую активность использовали штаммы, поддерживаемые в коллекции Казанского Научно исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (КНИИЭМ): *Candida albicans* Y-4, *Candida parapsilosis* E-10, *Candida tropicalis* Y-7. Скрининговые исследования антимикотической активности соединений проводили аппликационным диско-диффузионным методом на модифицированном агаре Сабуро [8]. Посевы тест-культур (суспензию спор) наносили из расчета 1 млн КОЕ/чашка. Исследуемые вещества растворяли в легколетучих растворителях (этанол, ацетон) для получения 10% раствора. Полученный раствор наносили на бумажные стерильные диски. Диски высушивали в стерильных условиях до полного удаления растворителя и помещали в чашку с культурой. Посевы инкубировали в течение 2-4 суток при 28°C [9]. Для контроля обрастания культуры с дисками выдерживали до 7 суток. В качестве положительных контролей использовали диски с противогрибковым препаратом «Нистатин».

3. Обсуждение результатов 2,2-Дигидроксиметилпропионовая кислота (DMPA) является мономером в синтезе коммерческих гиперразветвлённых полиэфирополиолов (ГРПО). Структурные звенья DMPA составляют не только основу платформы ГРПО, но и определяют характер терминальных групп [8] (рис.1). Рис. 1 - Схема синтеза

гиперразветвлённого полиэфирополиола второй генерации Терминальные гидроксильные группы DMPA являются реакционными центрами ГРПО, способными участвовать в процессах функционализации [1,3]. Введение терминальных координирующих групп, таких как карбоксильные и аминокгруппы, обеспечивает способность этих систем к образованию металлокомплексов с 3d-металлами, представляющих несомненный биохимический интерес [10-14]. Вместе с тем, сложная макромолекулярная структура металлополимерных комплексов затрудняет оценку строения координационного узла.

Моделирование комплексообразования с помощью низкомолекулярного структурного фрагмента гиперразветвленного полиэфира, а именно аминомодифицированного производного DMPA позволяет детализировать процессы формирования и структурные характеристики металлокомплекса. Синтез аминопроизводного метилового эфира 2,2-дигидроксиметилпропановой кислоты. Аминофункционализация DMPA проведена в три стадии. Первая стадия - синтез метилового эфира 2,2-дигидроксиметилпропионовой кислоты (2), вторая - получение диакрилатного производного метилпропионата (3) (рис.2). Рис. 2 - Схема синтеза диакрилатметилпропионата (3) При сопоставлении ИК-спектров соединения (2) и (3) наблюдается исчезновение широкой полосы ОН-групп при 3418 см⁻¹ и появление полосы кратных связей акрилатного фрагмента (1635 см⁻¹). В спектре ЯМР ¹H соединения (3) появляется система сигналов винильных протонов 6.31 м.д. дублет (СНАНВ=СНА); 6.05 м.д. квартет (СНАНВ=СНА). 5.8 м.д. дублет (СНАНВ=СНА). Метильные протоны сложноэфирных фрагментов ОС(О)ССН₃ проявляются в виде синглетов при δ 1.20 и 1.23 м.д. соответственно. Третья стадия заключается в присоединении диэтиламина по двойным связям диакрилатного производного метилового эфира DMPA (рис.3). Рис. 3 - Схема синтеза соединения (4) В ИК-спектре соединения (4) наблюдается полное исчезновение кратных связей винильного фрагмента при 1635 см⁻¹. Также имеются характеристические полосы валентных колебаний С=О группы при 1740 см⁻¹, связи С-О при 1133 см⁻¹, относящиеся к эфирным фрагментам. В спектре ЯМР ¹H аминопроизводного метилового эфира DMPA (соединение 4) наблюдается исчезновение сигналов винильных протонов в области 5.6-6.3 м.д. и появление сигнала метильных протонов диэтиламиногруппы в области 0.8-1.0 м.д., а также сигналов метиленовых протонов при атоме азота (2.4-2.5 м.д.) во фрагменте N-CH₂-CH₃. Соотношение интегральных интенсивностей протонов этильных групп при атоме азота к протонам метильной группы при четвертичном атоме углерода дизамещенной пропионовой кислоты однозначно указывают на количественное присоединение диэтиламина по двойным связям акрилатного фрагмента. Рис. 4 - ЯМР ¹H спектр соединения (4) в CDCl₃ Ионизация DMPA. Ионизация DMPA и её функционизированных производных в литературных источниках не представлены. Однако эта часть исследований имеет принципиальное значение для последующего обсуждения процессов

комплексобразования как производных DMPA, так и производных гиперразветвлённых полиэфиров на основе DMPA. Константы кислотной диссоциации соединения 1 определены с помощью рН-метрического титрования. Экспериментальные данные к расчету значений ступенчатых pK и максимальных долей накопления ионизированных форм обрабатывали с использованием метода математического моделирования по программе CPESSP с формированием модели существования в растворе всех теоретически возможных форм на основе метода Бринкли [7]. Установлено, что ионизация DMPA происходит в одну ступень, $pK_b=6,25$. Среднее значение ступенчатой константы основности аминопроизводного DMPA (соединение 4) определено по данным рН-метрического титрования графическим способом, $pK_b= 5.2\pm0.1$. Синтез и свойства комплексных соединений аминопроизводного метилпропионата (4а, 4б, 4в). Синтез осуществлён в одну стадию. В 90% водно-ацетоновом растворе проведены реакции соединения (4) с кристаллогидратами солей $Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O$, $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$, $Ni(NO_3)_2 \times 6H_2O$ (рис. 5). Рис. 5 - Схема синтеза металлокомплекса (4а) При смешении растворов соединения (4) и $Cu(NO_3)_2 \times 3H_2O$ произошло изменение цвета раствора с голубого на зеленый и наблюдалось выпадение комплексного соединения (4а) в виде осадка зеленого цвета. Образование комплексных соединений в системе соединение (4) - $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ зависит от концентрации иона $Co(II)$. При проведении реакции в соотношении компонентов 1:1 выпадает в осадок комплексное соединение кобальта синего цвета (4б), что указывает на тетраэдрическое окружение центрального атома. При соотношении реагентов 1:2 в осадок выпадает комплексное соединение фиолетового цвета (4б'), что может свидетельствовать об октаэдрической конфигурации координационного узла в данном случае. При синтезе комплекса $Ni(II)$ в осадок выпадает соединение (4в) светло-зеленого цвета. Методом ИК-спектроскопии установлено, что комплексобразование с ионами меди (II) происходит за счет связывания с атомом кислорода карбонильной группы (комплекс 4а), наблюдается уменьшение интенсивности полосы валентных колебаний $C=O$ группы в области 1735 см^{-1} и происходит расщепление сигнала на две полосы 1735 и 1709 см^{-1} . В ИК-спектре комплекса (4б) с ионами $Co(II)$ наблюдается только уменьшение интенсивности сигнала валентных колебаний карбонильной группы и смещение полосы поглощения в область 1733 см^{-1} . Оценка параметров комплексобразования соединения (4) с ионами Cu^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} . Рассмотрены координационные свойства соединения (4) с ионами $Cu(II)$, $Co(II)$ и $Ni(II)$ в растворе. На основании сравнительного изучения электронных спектров поглощения соединения (4) и комплексов (4а, 4б, 4в) в области длин волн $190-1100\text{ нм}$ установлено, что соединение (4) имеет полосу поглощения при 310 нм . Введение в растворы лиганда солей $Co(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$ или $Ni(NO_3)_2$ приводит к изменению спектральной картины вследствие образования комплексных соединений. Металлокомплексы (4а, 4б и 4в)

поглощают излучение в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Характеристики электронных спектров поглощения аминопроизводного метилового эфира DMPA и его комплексов в растворе представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристики электронных спектров поглощения нитратов Co(II), Cu(II), Ni(II) и металлокомплексов (4а, 4б, 4в) в ДМСО на фоне 0.1 моль/л LiClO₄

Соединение	λ , нм	ϵ тах, • моль ⁻¹ •см ⁻¹	$\Delta\lambda$, нм
Cu(NO ₃) ₂	840	37.09	4а
4а	771	33.80	57
Co(NO ₃) ₂	540	38.21	4б
4б	675	132.76	212
Ni(NO ₃) ₂	746	18.5	4в
4в	625	334,73	61

Интенсивные полосы поглощения в электронных спектрах комплексов обусловлены d-d переходами внешних электронов у центральных атомов комплексов, а также эффектом переноса заряда с лиганда на металл. Для расчета констант устойчивости и состава образующихся в растворе комплексных форм на основе данных электронных спектров поглощения использован метод изомолярных серий и молярных отношений [6]. Состав и константы устойчивости значимых комплексных форм соединений (4а, 4б и 4в) с двухзарядными ионами Co(II), Cu(II) и Ni(II) в воде рассчитаны графическим способом и приведены в табл. 2.

Таблица 2 - Составы и значения логарифмов констант устойчивости комплексных соединений Cu(II), Co(II) и Ni(II) соединения (4) в ДМСО на фоне 0.1 моль/л LiClO₄, сM(II)= 5×10⁻⁴- 7.5×10⁻³ сL=0.5×10⁻² моль/л № соедин. lg βⁿ L:M λ, нм

Соед.	λ, нм	L:M	lg β	α, %
4а	771	1:1	7.94±0.13	7.2
4б	675	1:1	6.44±0.07	2.7
4в	625	1:1	8.78±0.01	9.6

Рассчитанные значения использованы для дальнейшего математического моделирования процессов комплексообразования по программе CPESSP. Значения параметров образования наиболее устойчивых форм комплексов соединений (4а, 4б и 4в) в растворе представлены в табл. 3.

Таблица 3 - Параметры комплексообразования (lgβ) и доли накопления (α) соединения (4) с ионами Cu²⁺ (4а), Co²⁺ (4б) и Ni²⁺ (4в) № соедин. M λ, нм L:M lgβ α, %

Соед.	M	λ, нм	L:M	lgβ	α, %
4а	Cu(II)	771	1:1	7.94±13	7.2
4б	Co(II)	675	1:1	6.44±0.07	2.7
4в	Ni(II)	625	1:1	8.78±0.01	9.6

По данным моделирования процесса комплексообразования соединения (4) с ионами металлов (соединения 4а, 4б и 4в) наибольшее накопление имеет форма 1:1. Значения констант устойчивости соответствующих комплексных форм возрастает в ряду Co Cu Ni. Фунгицидная активность DMPA и её производных. В таблицах 4,5 приведены данные по фунгицидной активности и грибоустойчивости полученных соединений к некоторым штаммам Candida и плесневым грибам Aspergillus niger, Aspergillus fumigates, Trihoderma. Представлены средние результаты не менее пяти параллельных измерений для каждого соединения.

Таблица 4 - Фунгицидная активность и грибоустойчивость соединений (1, 4, 4а, 4б, 4в) к некоторым дрожжевым грибам Соед. Candida albicans Candida tropicalis Candida krusei

Соед.	Фунгицид. акт-ть	Обрастание
1	2 мм - 1 мм - 2 мм - 4	-----
4а	10 мм - 11мм - - +	4б
4б	Задерживает зону роста - - - - ++	4в
4в	- - - - ++	Нистатин
0 мм	Таблица 5	

Таблица 5 - Фунгицидная активность и грибоустойчивость соединений 4, 4а, 4б и 4в к некоторым плесневым грибам Соед. Aspergillus niger Aspergillus fumigatus Trihoderma

Фунгицид.акт-ть Обрастание Фунгицид.акт-ть Обрастание Фунгицид.акт-ть
Обрастание 1 - ++ - + - + 4 - - + - - 4а - - 4 мм - - - 4б - - - - - ++ 4в - - - - - ++