

© Коллектив авторов, 2010

Е. С. Рыжова¹, Д. А. Пантелеев¹, Ю. В. Чудецкая¹, А. А. Волков¹,
Н. Б. Мельникова¹, М. В. Гуленова¹, В. К. Османов¹, А. В. Борисов²

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ N-(6-МЕТИЛ-2,4-ДИОКСО-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРО-5Н-ПИРИМИДИНСУЛЬФОН)-N'-ИЗОНИКОТИНОИЛГИДРАЗИДА С КИСЛОТАМИ И ОСНОВАНИЯМИ В ВОДНЫХ СРЕДАХ

¹ Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, Россия,
E-mail: melnikow@rol.ru;

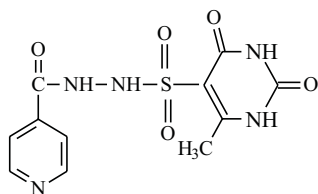
² Нижегородский государственный технический университет, Н. Новгород, Россия

Методами УФ-, ИК-, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии изучено влияние таутомерии на структуру продуктов реакции N-(6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-5Н-пиридинсульфон)-N'-изоникотиноилгидразида (кристафона) с кислотами (соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, янтарной, лимонной, гиалуроновой) и основаниями (гидроксидом натрия, триэтаноломином, трис-(оксиметил)-аминометаном) в водной среде. Проведено сравнение свойств кристафона со свойствами соединений, содержащих пиридиновый (изоникотингидразид, сульфотилизоникотингидразид) и пириимидиновый (бис-*para*-(2,4-диоксо-6-метилпириимидинил-5-сульфонамино)дифенилсульфон) фрагменты, в кислотно-основных средах. Показано улучшение иммунотропной активности при использовании фосфата кристафона и кристафона в растворе гиалуроновой кислоты.

Ключевые слова: Таутомерия, производные пиридина и пириимидина, кислотно-основные взаимодействия, органические кислоты, гиалуроновая кислота, трис-(оксиметил)-аминометан, триэтанолламин, специфическая иммунотропная активность.

В настоящее время особое внимание привлекают лекарственные вещества с комплексным иммуномодулирующим и антимикобактериальным действием [1]. К таким соединениям относится иммуномодулятор N-(6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-5Н-пиридинсульфон)-N'-изоникотиноилгидразид (кристафон), проявляющий активность в отношении микобактерий лепры и туберкулеза [1, 2].

Недостатками лекарственных средств на основе кристафона (Кри) являются крайне низкие биодоступность и растворимость как в воде, так и в липофильных средах. Эксперимент на кроликах показал, что 50 % Кри выводится из организма в неизменном виде [1]. Одним из путей повышения биодоступности амфотерного Кри является его модификация, приводящая к изменению гидрофильно-липофильного соотношения в молекуле.



кристафон (Кри)

Пиридиновый фрагмент проявляет основные свойства, а пириимидиновая часть обуславливает свойства

НН- или ОН-кислоты за счет лактим-лактамной таутомерии. В зависимости от среды можно ожидать изменения реакционной способности пиридинового и пириимидин-2,4-дионного циклов и соответственно гидрофильно-липофильных свойств модифицированного Кри.

Настоящая работа посвящена изучению свойств продуктов реакции кристафона в кислых и основных средах, позволяющее разрабатывать новые лекарственные формы с улучшенной биодоступностью.

В качестве основных сред были использованы растворы гидроксида натрия и мягких оснований: трис-(оксиметил)-аминометан, имеющий первичную аминогруппу и триэтанолламин, содержащий третичный атом азота.

Взаимодействие Кри с кислотами было исследовано на примере соляной кислоты и слабых кислот фосфорной и органических кислот: уксусной, лимонной, янтарной, винной и щавелевой, а также присутствующей в организме человека — гиалуроновой кислоты.

Экспериментальная часть

Материалы и реактивы: N-(6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-5Н-пиридин-сульфон)-N'-изоникотиноилгидразид (Кри) чистотой 99,9 % и диуцифон — бис-*para*-(2,4-диоксо-6-метилпириимидинил-5-сульфонамино)дифенилсульфон чистотой 99,7 % предо-

ставлен НПП ФГУП “Кристалл”, Дзержинск Нижегородской области. Триэтанолламин (ТЭА, ч.д.а.) и трис-(оксиметил)-аминометан (трисамин), фармацевтической чистоты получены в организации Мосхимфармпрепараты, Россия. Гиалуриновая кислота $M_R = 50000$ (SIGMA Chem. Co) была чистоты 99,0 %.

Приборы. ИК-спектры получены на инфракрасном спектрофотометре с преобразованием Фурье “IRPrestige-21”, фирма Shimadzu, Япония. Диапазон измерения $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$. Таблетки с KBr . ^{13}C ^1H ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах “Bruker Advance DPX-200” и “Bruker DRX SF=500”. УФ-спектры Кри получены на УФ-спектрофотометре “SPECORD S 100” фирмы “Analytik jena” (Германия) в кварцевых кюветках с толщиной слоя 10 мм. pH растворов измерены на pH-метре “pH-150M” РУП “Гомельский завод измерительных приборов”. Содержание углерода и азота установлено элементным анализом.

Сульфотоллизониазид синтезировали обработкой спиртового раствора 6 ммоль изониазида эквивалентным количеством толуолсульфохлорида. Смесь кипятили в течение 3 ч при перемешивании, выпавший осадок белого цвета отфильтровали, промывали горячим изопропиловым спиртом.

Натриевые соли Кри и диуцифона получали согласно методике [3]. 6,2 ммоль Кри или диуцифона растворяли в 13 мл раствора, содержащего 13 ммоль (для Кри) или 26 ммоль (для диуцифона) гидроксида натрия. После фильтрации и охлаждения приливали 60 мл этанола. Осадок отфильтровывали, промывали 20 мл спирта и сушили при 50°C .

Комплексы кристафона с триэтанолламином (ТЭА) получали добавлением 3 ммоль Кри в раствор, содержащий 35 % водный раствор ТЭА (соотношение растворов 1:4). Смесь с ТЭА нагревали на водяной бане при $70 - 80^\circ\text{C}$ в течение 10 мин до образования раствора желто-зеленого цвета. После охлаждения раствора до комнатной температуры добавляли 50 мл этанола. Осадок белого цвета отфильтровывали, промывали этанолом и сушили при 50°C .

Фосфат кристафона был получен растворением 9,2 ммоль Кри в 80 мл 0,1 М фосфорной кислоты при $60 - 65^\circ\text{C}$ при перемешивании в течение 1 ч. После охлаждения раствора добавляли 50 мл этанола и осадок белого цвета отфильтровывали, промывали этанолом и сушили при 100°C , $t_{\text{пл}} = 258^\circ\text{C}$ с разложением.

Идентификацию и количественное определение фосфат-ионов проводили методами pH-метрического титрования и фотоколориметрии [4 – 6].

Медико-биологические исследования. Специфическую иммунотропную активность растворов кристафона и его солевых комплексов исследовали с использованием половозрелых самцов белых беспородных крыс массой $185 \pm 2,5$ г и самцов мышей гибридов F1 (СВА × С57В16) $21 \pm 1,5$ г. Кровь брали из подъязычной вены животного в объеме 1,0 – 1,5 мл после 14 – 15 ч голодания в соответствии с СОП ЦНИЛ НижГМА. Опытные и контрольные группы состояли

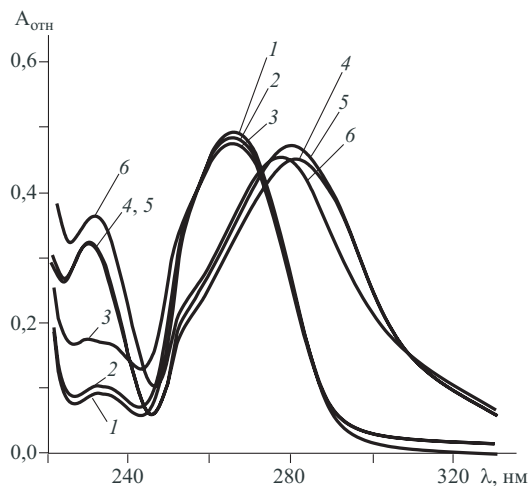


Рис. 1. УФ-спектры поглощения $3 \cdot 10^{-5}$ М растворов Кри при различных pH: 1 – 1,05; 2 – 2,00; 3 – 3,00; 4 – 11,00; 5 – 12,00; 6 – 13,03.

из 10 животных (всего 30), полученные из питомника “Столбовая” ГУ НЦ БМТ РАМН.

Оценку влияния на неспецифический иммунитет (фагоцитоз) проводили по показателям метаболической перестройки клеток, фиксируемой методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [7]. Для изучения влияния предлагаемых композиций на специфический гуморальный иммунитет животным вводили стандартный антиген и контролировали титр сывороточных антител (IgG). Влияние веществ на клеточный иммунитет изучали в реакции гиперчувствительности замедленного типа методом иммунизации эритроцитами барана.

Результаты и их обсуждение

Кри хорошо растворяется как в растворах соляной, фосфорной и органических кислот (уксусной, лимонной, винной, янтарной, щавелевой, гиалуриновой), так и в растворах оснований: гидроксидов щелочных металлов, ТЭА, трисамине. При добавлении этанола в водные реакционные смеси, содержащие Кри и такие реагенты как гидроксид натрия, ТЭА и фосфорную кислоту, получаются солевые комплексы в виде белых кристаллических осадков. Во всех остальных изучаемых системах солевые комплексы не осаждались.

Вид УФ-спектров Кри для солянокислых (pH 1 – 3) и щелочных растворов гидроксида натрия (pH 11 – 13) существенно различается (рис. 1).

В спектре кристафона в растворах HCl (Кри · HCl) и NaOH (Кри · NaOH) наблюдаются полосы поглощения в области 210 и 230 нм и основные полосы 265 нм (Кри · HCl) и 280 нм (Кри · NaOH) с плечом 247 – 252 нм. Оптическая плотность $A_{\text{отн}}$ при 230 нм имеет более высокие значения в щелочных средах, а в области 265 или 280 нм $A_{\text{отн}}$ практически не зависит от pH.

УФ-спектр натриевой соли кристафона (Кри · Na) в воде характеризуется основной полосой в области

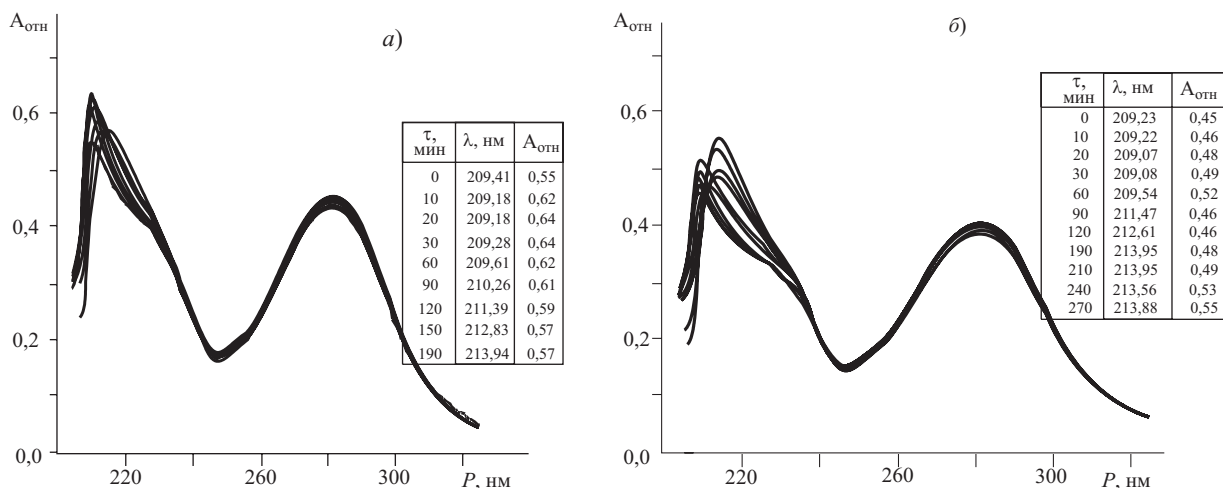


Рис. 2. Динамика изменения УФ-спектров поглощения $3 \cdot 10^{-5}$ М растворов кристафона (а) и натриевой соли кристафона (б) в 0,01 М растворе NaOH (эталон сравнения — 0,01 М раствор NaOH) в течение 4 ч.

267 нм. Изменения во времени УФ-спектров щелочных растворов Кри и Кри · Na аналогичны (рис. 2).

В обоих случаях положение и интенсивность полосы поглощения 280 нм остаются неизменными. Зависимости $\lambda_{max}(\tau)$ и $A_{отн}(\tau)$ в области 209 нм имеют 3 участка: А — с постоянным λ_{max} , на котором наблюдается сильное увеличение $A_{отн}$ ($\Delta A_{отн} \approx 0,1$); В — с монотонным возрастанием λ_{max} при снижении $A_{отн}$; С — участок с незначительными изменениями λ_{max} и $A_{отн}$ (рис. 3).

УФ-спектры Кри в водных растворах аминов характеризуются полосами поглощения с $\lambda_{max} = 280$ нм, аналогично спектру растворов Кри в щелочной среде (рис. 4). Спектр раствора солевого комплекса Кри с ТЭА (Кри · ТЭА) в воде имеет такую же полосу поглощения 265 нм (рис. 4), как и в спектрах кристафона в кислой среде и Кри Na в воде.

Растворение Кри в водных растворах всех органических кислот происходит при молярном соотношении, превышающем 1:15, в фосфорной кислоте — при соотношении 1:4 и в 0,2 % гиалуроновой кислоте. Наилучшей растворимостью ($0,86 \pm 0,05$ г · л⁻¹) в воде обладает продукт Кри · Н₃Р₄, по сравнению с исходным Кри ($0,02 \pm 0,005$ г · л⁻¹) при 20 °С. В растворах органических кислот возможно достижение более высокой концентрации Кри. Наиболее стабильные результаты получены при растворении Кри в 0,2 % растворе гиалуроновой кислоты — 0,5 и 1,1 г · л⁻¹ при рН 5,8 и 8,4 соответственно.

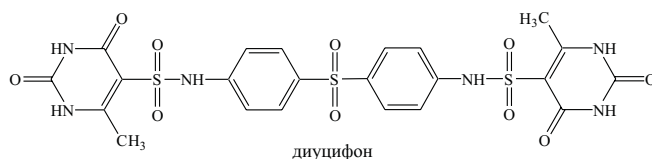
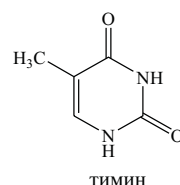
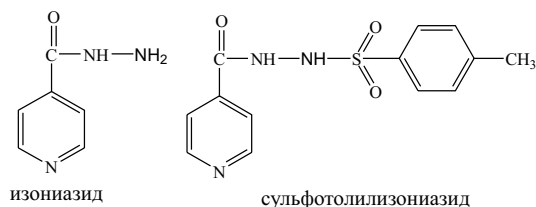
Основные полосы поглощения УФ-спектров Кри в растворах всех названных кислот совпадают (рис. 5).

УФ-спектр раствора фосфата Кри в воде не отличается от спектра исходного Кри в фосфорной кислоте (рис. 5, 2, 1).

Положение в спектре полосы поглощения в области 260–265 нм относится к суммарной полосе карбонильных групп в изониазидном и сульфопиримидиновом фрагментах Кри в солянокислой среде, что подтверждается УФ-спектрами кислых растворов веществ, имеющих такие же хромофорные группы: тимин ($\lambda_{max} =$

260 нм), изониазид ($\lambda_{max} = 265$ нм), сульфотилизо-ниазид ($\lambda_{max} = 265$ нм).

В ПМР-спектрах Кри · Н₃Р₄, Кри · НСl сигналы и химические сдвиги протонов в пиридиновом фрагменте Кри сдвигаются в область больших значений, а в Кри · Na, Кри · ТЭА остаются практически неизменными (табл. 1). Наибольшие изменения происходят в пиримидиновой части молекул и в гидразидной группе: в соединениях Кри · Na, Кри · ТЭА, Кри · Н₃Р₄, а также у натриевой соли диуцифона исчезают сигналы протонов (табл. 1).



В ¹³С ЯМР-спектры Кри и продуктов его модификации химические сдвиги всех атомов углерода изменились. Наибольшие изменения произошли у С₁₀, связанного с метильной группой и NH-пиримидинового цикла, а также у С₁₁ метильной группы в солевом комплексе Кри ТЭА (табл. 2).

В ИК-спектрах Кри НСl интенсивность полосы валентных колебаний связей =С-Н ароматического пиридинового кольца в области 3440 см⁻¹ увеличилась в 3–4 раза при одновременном усилении поглощения

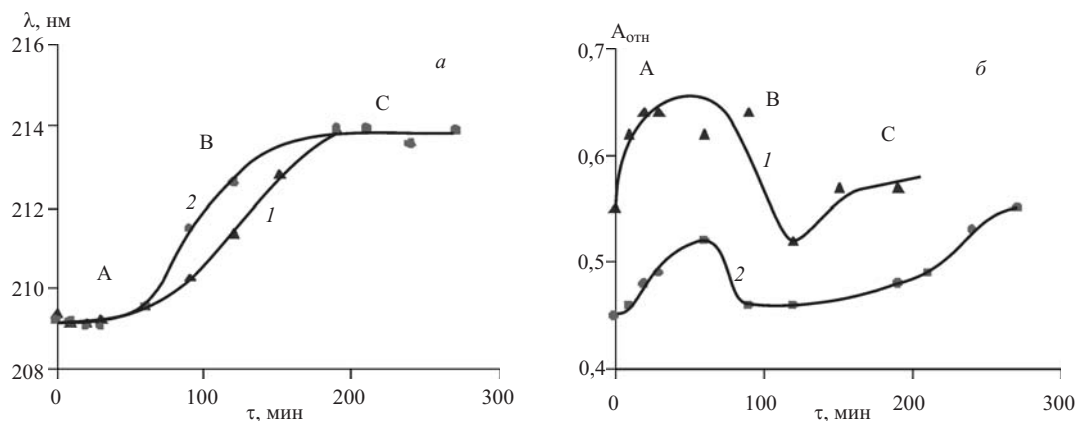


Рис. 3. Изменение длины волны (а) и оптической плотности (б) от времени в 0,01 М растворе NaOH: 1 – $3 \cdot 10^{-5}$ М Кри; 2 – $3 \cdot 10^{-5}$ М Кри · Na.

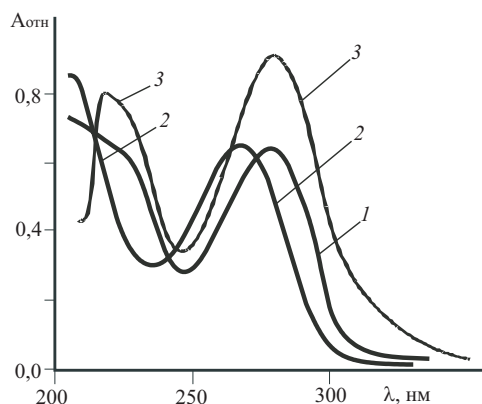


Рис. 4. УФ-спектры поглощения водных растворов: 1 — смесь Кри и ТЭА (1:8); 2 — продукт реакции Кри с ТЭА (Кри · ТЭА); 3 — смесь Кри и трисамина (1:8).

во всей области $3400 - 3000 \text{ см}^{-1}$. В спектрах Кри · Na, Кри · NaOH, Кри · H_3PO_4 наблюдалось резкое уменьшение интенсивности этой полосы.

В спектре Кри интенсивные узкие полосы 1662 и 1658 см^{-1} , обычно проявляющиеся как 1 полоса 1664 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ во вторичной амидной группе, амид I), и полосы 1543 см^{-1} и 1528 см^{-1} (смешанное валентно-деформационное колебание связей NH и $\text{C}-\text{N}$, амид II), также присутствуют в спектрах Кри · Na, Кри H_3PO_4 , Кри · HCl , Кри · ТЭА. Возможны небольшие смещения и изменение интенсивностей этих полос (табл. 3).

Узкая интенсивная полоса 3308 см^{-1} (колебания NH в гидразидной части Кри) наиболее сильно трансформирована в спектре Кри · HCl и появляется как слабо выраженное плечо 3292 см^{-1} , а в спектрах Кри · Na, Кри · ТЭА, Кри · H_3PO_4 она смещена (табл. 3).

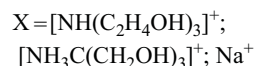
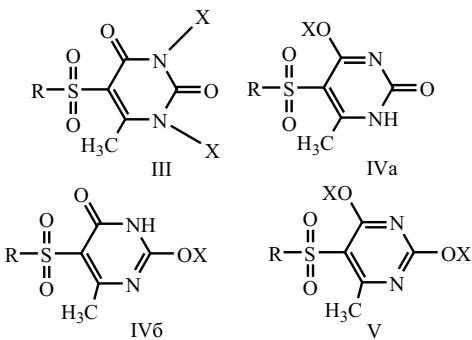
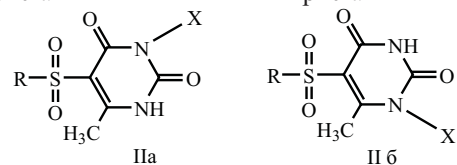
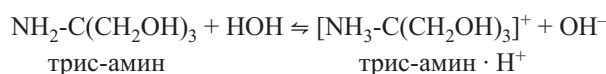
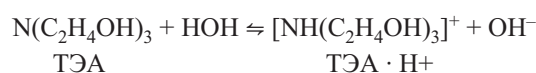
Лактамные $\text{C}=\text{O}$ полосы в виде дублетов: 1745 и 1720 см^{-1} (инт. узкие), а также 1693 и 1680 см^{-1} (инт. узкие) в Кри, 1732 , 1687 и 1668 см^{-1} в диуцифоне, 1748 , 1684 см^{-1} в тимине, полностью исчезают у Кри · Na и натриевой соли диуцифона (табл. 3). В ИК-спектрах Кри · ТЭА и Кри · H_3PO_4 эти полосы

смещены, интенсивность их мала и соотношение их интенсивностей меняется (табл. 3).

Структуры Кри в кислых и основных средах, вероятно, будут обусловлены как лактим-лактамной таутомерией в пиримидиновом кольце (схема), так и изменением структуры ионизационного фрагмента.

В лактимной (енольной) форме молекулы Кри водород гидроксильной группы способен образовывать водородную связь с кислородом сульфогруппы, расположенной рядом. При этом перераспределение электронной плотности в пиримидиновом цикле может обуславливать ионизацию и возникновение ионных структур типа Id.

Сульфооксопиримидиновый фрагмент (R') в присутствии оснований (гидроксид натрия, триэтанолмин, трис-(оксиметил)аминометан) в воде способен образовывать как лактимные структуры по атому кислорода, так и комплексы (или соли), обусловленные NH -кислотностью:



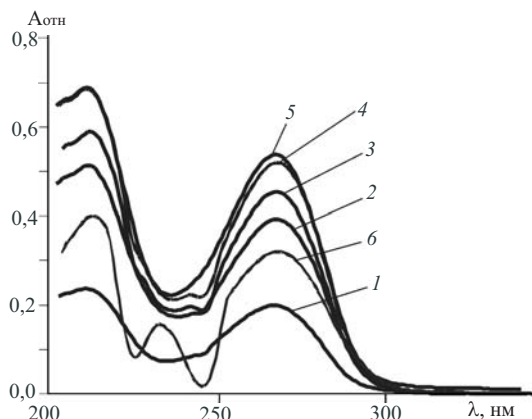
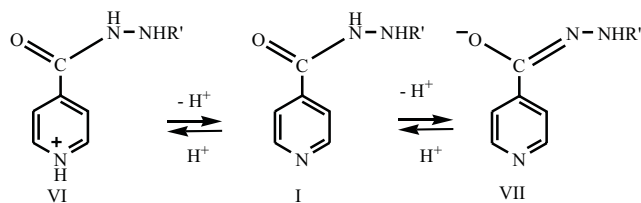


Рис. 5. УФ-спектры поглощения: 1 – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М Кри в 0,1 М растворе фосфорной кислоты; 2 — фосфата Кри (Кри H_3PO_4) в воде; 3, 4, 5 – $5 \cdot 10^{-5}$ М Кри в растворах янтарной, лимонной и щавелевой кислот, соответственно; 6 – $2,5 \cdot 10^{-5}$ М Кри в растворе гиалуроновой кислоты.

Изоникотингидразидный фрагмент (R), вероятно, будет близок по своим свойствам к изониазиду. Известно, что изониазид в неионизированной форме существует при значениях pH от 6,6 до 8,1 и при $\text{pH} < 1,6$ проявляет себя как основание, образуя сопряженную кислоту, а при $\text{pH} > 13,2$ ведет себя как кислота, превращаясь в сопряженное основание.



где R' — сульфкопиримидиновый фрагмент.

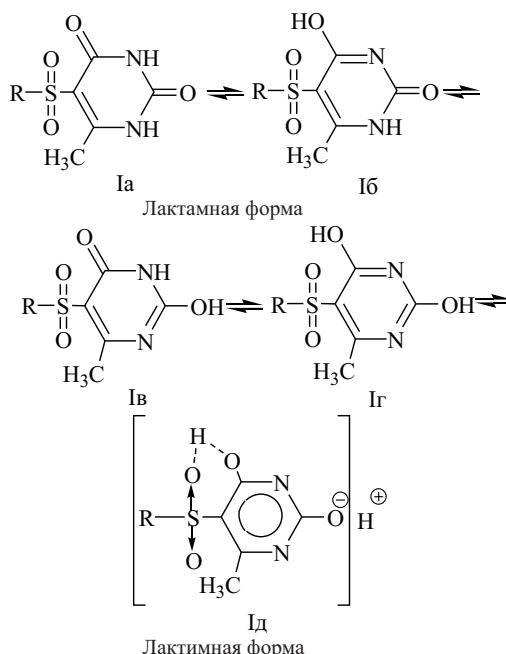


Схема. Лактим-лактанная таутомерия Кри (I). R-изоникотингидразидный фрагмент.

Под действием оснований в растворе кроме ионизации карбонильной группы в изоникотингидразидном фрагменте R возможны как переход исходных соединений (изониазида или Кри) в предельную структуру VII с дальнейшим взаимодействием с катионом натрия, так и замещение гидразидного атома водорода на натрий. Эти конкурентные реакции, вероятно, реализуются для изониазида, что подтверждается более сложным УФ-спектром в щелочной среде (рис. 6).

Несколько полос карбонильной группы: 2 в области 270 – 315 нм, 1 в области 240 нм и 2 полосы

Таблица 1

Данные ПМР-спектров солевых комплексов Кри

Соединение	Химический сдвиг δ, м. д.			
	CH_3			
Кри	2,35	(5)-7,65 (дублет), (6)-8,75 (дублет)	9,25 (дублет), 10,85 (дублет)	(1)-11,65 (2)-11,50 На 2 протона
Кри · HCl	2,35, 2,50	(5)-7,8 (дублет) (6)-8,851, 8,854(дублет)	9,35 (дублет) 11,00 (дублет)	(1)-11,65 (дублет) (2)-11,55 (дублет)
Кри · H_3PO_4	2,6	8,35 (дублет) 9,01 (дублет)	-	-
Кри · Na	2,55	(5)-7,647, 7,652 (дублет), (6)-8,569, 8,577 (дублет)	-	-
Натриевая соль диуцифона*	2,48, 2,47	-	-	-
Кри · ТЭА	2,51	(5)-7,64, 7,67 (дублет) (6)-8,67, 8,70 (дублет)	-	-
Смесь Кри и ТЭА в D_2O	2,34	(5)-7,46, 7,48 (дублет) (6)-8,41, 8,43 (дублет)	-	-

Примечание: * — протоны в фенильных группах 7,033; 7,052 (дублет), 7,580; 7,595 (дублет).

210 – 230 нм, вероятно, обусловлены $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами ионизированной карбонильной и $-\text{C}=\text{N}$ -групп в структурах I и VII.

Соединению Кри · Na, вероятно, соответствуют структуры IV – V, о чем свидетельствует исчезновение сигналов протонов в лактамном цикле в ПМР-спектре, отсутствие полос поглощения лактамных $\text{C}=\text{O}$ групп в ИК-спектре, а также практическое отсутствие полосы валентных колебаний N-H в лактамном цикле кристафона, проявляющихся в области 3190 см^{-1} и полосой в области 3067 см^{-1} (табл. 3) (комбинационной полосой валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ и деформационных колебаний N-H).

Изониазидный фрагмент при этом практически остается неизменным. Как было показано выше, УФ-спектры Кри · NaOH и Кри · Na в воде и Кри в растворе NaOH (pH 11 – 13), а также Кри в растворах ТЭА и трисамина имеют одинаковую полосу в области $\lambda_{\text{max}} = 277 – 282 \text{ нм}$ (рис. 1, 3, 4), что подтверждает преимущественное существование в растворах оснований сульфоксопиримидинового цикла в лактимной форме. В УФ-спектре диуцифона с 2 сульфоксопиримидиновыми циклами, отмечаются 2 полосы лактимной формы (рис. 6). Исследование динамики изменения поглощения в области 190 – 230 нм в воде (Кри · NaOH; Кри · Na) и щелочных растворах (Кри) (рис. 2), показывает высокую подвижность атомов водорода и натрия в гидразидной части Кри и соответственно существование одновременно в растворе нескольких частиц. Растворение соединений в щелочи на I этапе, вероятно, приводит к ионизации за счет увеличения доли $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов в частицах (увеличение $A_{\text{отн}}$ при $\lambda \approx \text{const}$, участок А на рис. 3), а на II этапе происходит увеличение длины связи $\text{C}=\text{O}$ в частицах и снижение доли $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов (увеличение λ при снижении $A_{\text{отн}}$, участок В на рис. 3).

Можно предположить, что из щелочной среды, стабилизирующей лактимные формы IV – V, под действием этанола осаждается преимущественно менее гидрофильное соединение структуры IVб. Об этом же свидетельствуют и ^{13}C ЯМР спектр Кри · Na в

ДМСО- d_6 , в котором максимальные изменения химического сдвига произошли у атома углерода пиримидинового цикла, связанного с CH_3 -группой и с третичным основным атомом азота.

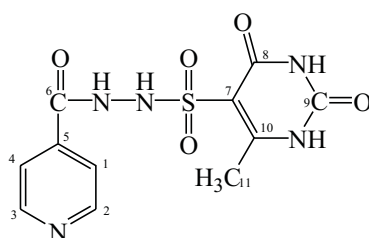
Доказательством структуры IVб для Кри · Na являются также данные неводного титрования продукта хлорной кислотой в среде муравьиной кислоты и уксусного ангидрида. Кри · Na взаимодействует с хлорной кислотой как соединение, имеющее 2 основных реакционных центра (атомы азота в пиримидиновом и лактимном пиримидиновом циклах), в отличие от Кри, который в этих условиях проявляет себя как одноосновное соединение [2].

Структуру типа IIб можно предположить для Кри · ТЭА, для которого максимальные изменения химического сдвига произошли не только у атома углерода пиримидинового цикла, связанного с CH_3 -группой и с третичным основным атомом азота, а и для C11-метильной группы (δ изменился с 18,13 до 49,1 м.д.). В среде ТЭА, наиболее вероятно, образуются комплексные соединения, обусловленные взаимодействием N-H кислотных групп лактамного цикла с основным атомом азота ТЭА. Подтверждением этого предположения является исчезновение полос поглощения N-H лактамных групп в ИК-спектре и небольшие изменения полос $\text{C}=\text{O}$ лактамных групп. В ПМР-спектрах Кри · ТЭА отсутствуют сигналы протонов N-H лактамного цикла. ПМР-спектр реакционной смеси, содержащей Кри, четырехкратный избыток ТЭА и D_2O , изменяется практически моментально после добавления ТЭА в суспензию Кри в D_2O (табл. 1) и совпадает с ПМР-спектром Кри · ТЭА. Косвенным доказательством структуры IIб для Кри · ТЭА является полоса поглощения в области 265 нм в воде, характерная для лактамной формы.

Для Кри · HCl наиболее вероятна солевая форма типа VI, характеризующаяся наибольшим изменением ПМР-спектра в изониазидном фрагменте, а также исчезновением узкой интенсивной полосы 3308 см^{-1} в ИК-спектре, увеличением в 3 – 4 раза интенсивности поглощения в области пиримидинового скелета

Таблица 2

^{13}C ЯМР-спектры продуктов взаимодействия Кри с основными реагентами



Соединение	Растворитель	Химический сдвиг, δ , м. д.						
		5	6	7	8	9	10	11
Кри	ДМСО- d_6	110,0	139,3	164,5	160,2	158,7	149,7	18,13
Кри · Na	ДМСО- d_6	106,0	146,5	170,0	165,0	160,9	158,3	24,63
Кри · ТЭА	D_2O	106,0	143,7	169,4	164,9	163,8	158,7	49,1

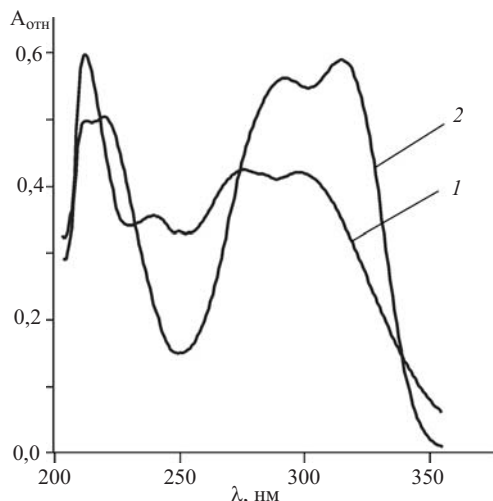
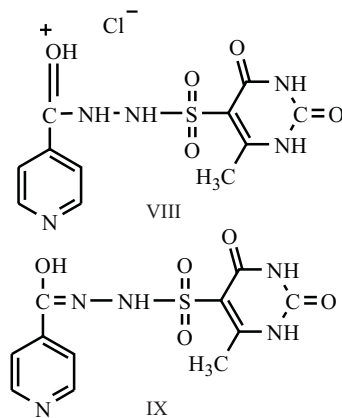


Рис. 6. УФ-спектры поглощения растворов изониазида (1) и диуцифона (2) в 0,01 М NaOH.

3440 cm^{-1} . Не исключено, что эта широкая полоса может включать валентные колебания O-H 3200 – 2500 cm^{-1} , типичную для соединений с предельными структурами VIII, IX, которая может быть получена за счет внутримолекулярной водородной связи в амидной группе изониазидного фрагмента. Известно, что карбонильный кислород оказывается наиболее основным в молекуле амида и можно предположить, что взаимодействие Кри с HCl происходит также и по карбонильному кислороду амидной группы. Фактором, который способствует стабильности O-протонированной формы, является способность этой формы к делокализации π -орбитали по всей O-C-N-системе и соответственно делокализации заряда.

Для фосфата Кри (Кри · H_3PO_4), так же как и для Кри · HCl, характерна лактамная форма VI и структуры типа VIII, IX. Сохранение лактамной формы при

растворении твердого Кри · H_3PO_4 в воде (рис. 5) и в растворе HCl ($\lambda_{\text{max}} = 267$ нм, рис. 1) и переход в лактамную при растворении в щелочном растворе ($\lambda_{\text{max}} = 280$ нм), также как и исходного Кри, свидетельствует о неизменности пиримидинового фрагмента в молекуле. Включение 1 молекулы фосфорной кислоты доказано потенциометрическим титрованием и количественным определением фосфора в осадке Кри · H_3PO_4 . Содержание фосфора в осадке составляет 6,9 %, что немного ниже теоретически рассчитанного (7,1 %) для солевого комплекса, содержащего 1 молекулу фосфорной кислоты.



Можно предположить, что как наибольшая растворимость солевого комплекса Кри · H_3PO_4 (VI) в воде, так и минимальное изменение растворимости Кри · H_3PO_4 при хранении связаны с природой фосфат ионов, позволяющих влиять на физико-химические свойства производных Кри. Межмолекулярные взаимодействия, обусловленные фосфатными ионами могут изменять и другой тип взаимодействий между пиримидиновыми гетероциклами в направлении, перпендикулярном плоскости колец. Обычно между плоскостью гетероциклов водородные связи отсутствуют, а

Таблица 3

Данные ИК-спектров пиридиновых и пиримидиновых производных

Соединение	Волновые числа, ν , cm^{-1}		
	3330 – 3000	1750 – 1670	1670 – 1500
Изониазид	3312 узк. ср., 3196 плечо, 3116 узк. инт.	—	1672 узк. инт., 1640 узк. ср. 1608 узк. пер., 1564 узк. инт.
Сульфотилили- зоназида	3192 узк. пер., 3104 узк. инт.	—	1688 узк. инт., 1635 узк. пер. 1596 узк. инт., 1532 узк. пер.
Тимин	3204 ш. пер, 3068 ср. пер. 3036 ср. пер.	1748 узк. инт. 1684 узк. инт.	—
Кри	3308 узк. инт., 3190 ср. пер. 3067 инт. ш.	1745 пер.инт., 1728 узк. инт., 1693 и 1680 узк. инт. (или одна 1689 узк. инт.)	1658 и 1662 узк. инт. (или одна 1664 узк. инт.), 1543 узк. инт., 1528 узк. инт.
Кри · Na	3292 узк. инт., 3131 ш. пер.	—	1664 узк. инт., 1627 ср. инт. 1605 узк. инт., 1556 узк. пер. 1523 узк. пер. 1668 узк. инт., 1593 узк. инт.
Диуцифон	3308 сл. пер, 3252 сл. пер, 3192 сл. пер, 3142 сл. пер, 3061 сл. пер	1732 ш. инт. 1687 узк. инт.	—
Диуцифон Na	3152 ш. пер., 3138 ш. пер.	—	1628 ш. инт., 1585 ср. инт.
Кри · ТЭА	3327 узк. инт., 3309 плечо, 3051 ш. пер., 3068 плечо	1738 узк. инт. 1711 узк. инт. 1692 узк. инт., 1682 узк. инт.	1663 узк. инт., 1589 узк. инт. 1547 узк. инт., 1502 узк. инт.
Кри · HCl	3292 сл. пер., 3110 плечо, 3064 ш. пер.	1743 узк. инт., 1730 узк. инт. 1676 узк. инт.	1660 узк. инт, 1608 узк. пер., 1581 узк. пер. 1527 узк. сл., 1502 узк. сл.
Кри · H_3PO_4	3292 узк. инт., 3068 узк. инт.	1749 узк. инт., 1734, узк. инт, 1693 узк. инт., 1677 узк. инт	1667 узк. инт., 1638 узк. пер. 1579 узк. пер., 1566 узк. пер.

диполь-дипольные взаимодействия достаточно сильны, и энергетически выгодным оказывается параллельное расположение циклов (стекинг-взаимодействия) [8]. Не исключено, что фосфат ионы, влияя на стекинг-взаимодействия, улучшают растворимость Кри · Н₃Р₀₄ в водных растворах.

Показано улучшение иммуотропной активности 2 композиций модифицированного Кри в концентрации 0,5 мг/мл. Количество IgG антител у мышей (титр реакции), иммунизированных эритроцитами барана, изменялось от 1:36 (контроль) до 1:226 (смесь Кри и гиалуроновой кислоты) и 1:233, (Кри · Н₃Р₀₄). Для этих композиций отмечено достоверное увеличение интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа по изменению среднего диаметра отека участка, а также композиции практически не снижают реактивность (готовность к фагоцитозу) нейтрофилов.

Таким образом, проведенные нами исследования показывают, что природа кислотного или основного реагента влияет не только на таутомерию Кри в вод-

ных средах, но и позволяет получить новые продукты с разнообразными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Н. Голощапова, *Автореф. дис. ... докт. мед. наук*, Москва (1997).
2. ФСП 42-0037-4715-03 Кристафон N'-изоникотиноил-6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-пиримидин-5-сульфогидразид. ФГУП "ГосНИИ "Кристалл" (2003), с. 14.
3. Патент РФ 2141322, Голощапов Н. М., Голощапова Е. Н. (РФ), *Бюл. изобрет.*, 32 (1999).
4. У. Дж. Уильямс, *Определение анионов. Справочник*, Химия, Москва (1982), сс. 462, 484.
5. ГФ XI, выпуск 1, *Общие методы анализа*, Медицина, Москва (1987), с. 164.
6. Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбникова, *Химический анализ производственных сточных вод*, Химия, Москва (1974).
7. Т. Тono-Ока, N. Ueno, T. Matsumoto, *Clin. Immunol. Immunopatol.*, **26**(1), 66 – 75 (1983).
8. Д. Е. Мецлер, *Биохимия. Химические реакции в живой клетке*, Мир, Москва (1980).

Поступила 20.02.09

CHEMICAL PROPERTIES AND IMMUNOTROPIC ACTIVITY OF THE PRODUCTS OF INTERACTION OF N-(6-METHYL-2,4-DIOXO-1,2,3,4-TETRAHYDRO-5H-PYRIMIDINESULFONE)-N'-ISONICOTINOYLHYDRAZIDE WITH ACIDS AND BASES IN AQUEOUS MEDIA

E. S. Ryzhova¹, D. A. Panteleev¹, Yu. V. Chudetskaya¹, A. A. Volkov¹, N. B. Mel'nikova^{1*}, M. V. Gulenova¹, R. V. Osmanov¹, and A. V. Borisov²

¹ Nizhni Novgorod State Medical Academy, Nizhni Novgorod, Russia;

² Nizhni Novgorod State Technical University, Nizhni Novgorod, Russia

* e-mail: melnikow@rol.ru;

The effect of tautomerism on the structure of products of the reactions of N-(6-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5H-pyrimidinesulfone)-N'-isonicotinoylhydrazide (kristafon) with acids (hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, succinic, citric, hyaluronic) and bases (sodium hydroxide, triethanolamine, tris-hydroxymethylaminomethane) in aqueous media has been studied using UV, IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy techniques. The properties of kristafon are compared to those of analogous compounds containing pyridine, (isonicotine hydrazide, sulfotolyl isonicotine hydrazide) and pyrimidine [bis-p-(2,4-dioxo-6-methyl pyrimidinyl-4-sulfonamino)-diphenylsulfone] fragments in acid – base media. It is shown that the immunotropic activity of kristafon phosphate and kristafon are improved in hyaluronic acid solutions.

Key words: Tautomerism, pyridine and pyrimidine derivatives, acid-base interactions, organic acids, hyaluronic acid, tris-(oxymethyl)-aminomethane, triethanolamine, specific immunogenicity activity.