

## Образование и бактериостатические свойства комплексов $\text{Ag}^{\text{II}}$ и $\text{Cu}^{\text{II}}$ с тетратозилатом мезо-тетракис(*N*-метил-4-пиридил)-порфирина

А. С. Вашурин,<sup>@a</sup> С. Г. Пуховская,<sup>a</sup> Е. В. Гарасько,<sup>b</sup> А. А. Воронина,<sup>a</sup>  
О. А. Голубчиков<sup>a</sup>

Посвящается Член-корреспонденту РАН Оскару Иосифовичу Койфману  
по случаю его 70-летнего юбилея

<sup>a</sup>Институт химии макрогетероциклических соединений, Ивановский государственный химико-технологический университет, 153000 Иваново, Россия

<sup>b</sup>Ивановская государственная медицинская академия, 153000 Иваново, Россия

<sup>@E-mail:</sup> [asvashurin@mail.ru](mailto:asvashurin@mail.ru)

*Изучена кинетика образования и устойчивость комплексов серебра и меди с тетратозилатом мезо-тетракис(*N*-метил-4-пиридил)порфирина в водных средах. Показана бактериостатическая активность без действия света для полученных металлопорфиринов.*

**Ключевые слова:** Порфирин, комплексообразование, водный раствор, бактериостатическая активность.

## Formation and Bacteriostatic Properties of $\text{Ag}^{\text{II}}$ and $\text{Cu}^{\text{II}}$ Complexes of *meso*-Tetrakis(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrin Tetratosylate

Arthur S. Vashurin,<sup>@a</sup> Svetlana G. Pukhovskaya,<sup>a</sup> Ekaterina V. Garasko,<sup>b</sup>  
Alena A. Voronina,<sup>a</sup> and Oleg A. Golubchikov<sup>a</sup>

Dedicated to the Corresponding member of Russian Academy of Sciences  
Prof. Oscar I. Koifman on the occasion of his Anniversary

<sup>a</sup>Research Institute of Macroheterocyclic Compounds, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 153000 Ivanovo, Russia

<sup>b</sup>Ivanovo State Medical Academy, 153000 Ivanovo, Russia

<sup>@Corresponding author E-mail:</sup> [asvashurin@mail.ru](mailto:asvashurin@mail.ru)

*The kinetics of coordination of tetratosylate meso-tetrakis(*N*-methyl-4-pyridyl)porphyrin with copper and silver salts in aqueous solutions, as well as the bacteriostatic activity of the obtained complexes without light conditions were studied.*

**Keywords:** Porphyrin, complex formation, aqueous solution, bacteriostatic activity.

## Введение

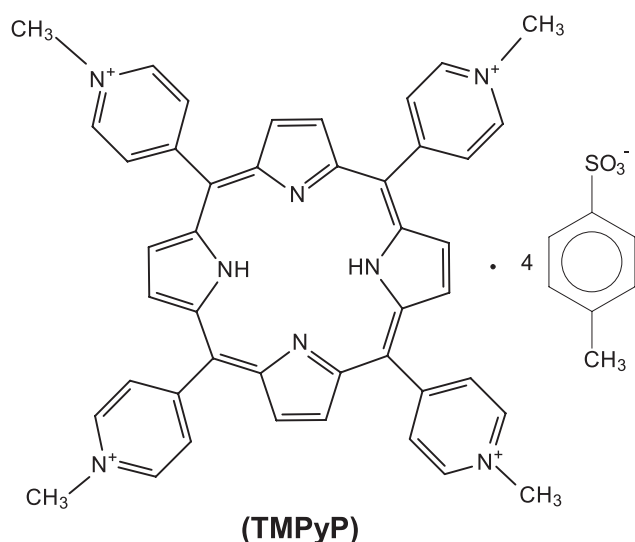
Комплексы металлопорфиринов привлекают все большее внимание ввиду проявления ими каталитической<sup>[1-7]</sup> и биологической<sup>[8-9]</sup> активности. Они являются перспективными исходными соединениями для синтеза ряда лекарственных препаратов для фотодинамической диагностики и терапии раковых опухолей.<sup>[10-12]</sup> Некоторые из них успешно прошли доклинические и клинические испытания и применяются на практике.<sup>[13]</sup> Также известна фотобиологическая активность металлопорфиринов как инактиваторов бактерий<sup>[14]</sup> и вирусов.<sup>[15]</sup> Однако следует отметить, что большинство работ в данной области посвящено фотоактивности порфириновых молекул, и лишь в ряде из них рассматривается их темновая активность.<sup>[16]</sup>

Поэтому исследование процессов образования и устойчивости металлопорфиринов вызывает определенный научный и практический интерес с точки зрения определения условий их синтеза и устойчивости в агрессивных средах.

В настоящей работе получены комплексы меди и серебра с тетраозилазом мезо-тетракис(*N*-метил-4-пиридил)порфирина. Выполнены кинетические исследования их образования, определена устойчивость, а также изучена темновая бактериостатическая активность.

## Экспериментальная часть

Тетраозилаз мезо-тетракис(*N*-метил-4-пиридил)порфирина (ТМРyP) был получен и очищен в соответствии с известной методикой.<sup>[3,17]</sup>



Процесс комплексообразования порфирина с ацетатами меди и серебра, а также нитратом меди исследовали спектрофотометрическим методом в термостатируемой ячейке в диапазоне температур 288-348 К. Точность поддержания температуры составила 0.1 К. Электронные спектры поглощения (ЭСП) регистрировали на спектрофотометрах Shimadzu UV-1800 и Hitachi U-2000. Известно, что образование металлопорфирина протекает по уравнению первого кинетического порядка относительно макроциклического лиганда.<sup>[18]</sup> Кинетические измерения проводились в условиях стократного избытка соли по отношению к лиганду, что позволило произвести расчет

эффективных констант скорости ( $k_{ef}$ ) реакции (1)



по уравнению (2)

$$k_{ef} = (1/\tau) \ln[(A_0 - A_\infty)/(A - A_\infty)], \quad (2)$$

где  $A_0$ ,  $A$ , and  $A_\infty$  - начальное, текущее и конечное значение оптической плотности раствора соответственно.

Значения истинных констант ( $k$ ) скорости реакции (1) были рассчитаны по уравнению второго порядка:

$$k = k_{ef} / c_{sol} \quad (3)$$

Энергию активации ( $\Delta E$ ) в исследуемом диапазоне температур рассчитывали по уравнению Аррениуса

$$E^\ddagger = 19.1 [T_1 \cdot T_2 / (T_2 - T_1)] \cdot \lg(k_2/k_1) \quad (4)$$

Расчет энтропии активации ( $\Delta S^\ddagger$ ) проводили по формуле

$$\Delta S^\ddagger = 19.1 \ln k_2^{298} + E^\ddagger / 298 - 253 \quad (5)$$

Ацетаты меди и серебра, а также нитрат меди предварительно перекристаллизовывали и высушивали при 380-390 К.<sup>[19]</sup> Кинетику диссоциации металлопорфиринов исследовали спектрофотометрическим методом при титровании соответствующих растворов серной кислотой.

Образцы для анализа бактерицидной активности готовили нанесением порфиринов на фильтровальную бумагу из соответствующих водных растворов ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Исследуемые образцы размером  $1 \times 1$  см раскладывали в чашки Петри с тест-культурами *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и грибами *Candida albicans*. Исследования проводили в жидкой и плотной питательных средах.

Элементный анализ был выполнен с помощью хроматографического анализатора Flash HCNS-OEA 1112. Скорость подачи гелия составила 140 мл/мин, скорость подачи кислорода 250 мл/мин; температура в реакторе 1173 К. Для AgTMPP найдено, %: C 58,25; H 4,61; O 13,07; N 7,85; S 8,46;  $C_{72}H_{64}O_{12}N_8S_4$ ; рассчитано, %: C 58,85; H 4,57; O 13,17; N 7,62; S 8,73.

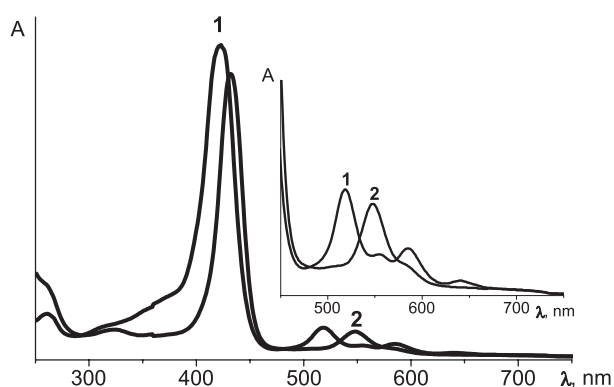
## Результаты и обсуждение

Ранее нами было установлено, что ТМРyP не ассоциирован в водных растворах в широком диапазоне концентраций и pH,<sup>[3]</sup> что позволяет анализировать полученные кинетические данные с учетом мономерной формы макроцикла в растворе.

Процесс образования металлопорфиринов с солями *d*-металлов подчиняется кинетическому уравнению ( $n+1$ ) порядка и легко контролируется по изменению электронного спектра поглощения (Рисунок 1).

Для всех изученных систем установлен первый кинетический порядок по порфирину-лиганду, который подтвержден прямолинейностью зависимостей в координатах  $\lg(c_{H_2TMPP}^0 / c_{H_2TMPP}) - \tau$ . В спектрах реагирующих систем регистрировались изобестические точки.<sup>[17]</sup>

Порядок реакции по соли определяли экспериментально путем измерения зависимости эффективной константы скорости ( $k_{эф}$ ) реакции комплексообразования от концентрации соли. В нашем случае при pH водного буферного раствора равно 6, порядок реакции по  $Cu(NO_3)_2$ ,  $Cu(OAc)_2$  и  $AgOAc$  равен единице.



**Рисунок 1.** Изменения ЭСП ТМРyP ( $c = 5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) при комплексообразовании с AgOAc ( $c = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л) в водном растворе при  $T = 298.15$  К. (1 – ТМРyP, 2 – AgТМРyP).

Параметры координации ТМРyP ацетатом и нитратом меди, а также ацетатом серебра представлены в Таблице 1.

Высокая скорость реакции ацетата меди, безусловно, обусловлена наложением двух факторов: частичным гидролизом соли и эффектом Яна-Теллера. Благодаря первому, совместно с малоактивным гексааквакомплексом  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]$  в растворе присутствует более активный  $[\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]$ , благодаря второму – комплексы  $\text{Cu}^{2+}$  имеют искаженную октаэдрическую структуру (квадратно-бипирамидальную) с двумя существенно удлиненными и ослабленными связями  $\text{Cu}-\text{H}_2\text{O}$ .

В ходе реакции образования AgТМРyP катион  $\text{Ag}^+$  в составе металлопорфирина окисляется до  $\text{Ag}^{2+}$ . Неустойчивая степень окисления, очевидно, стабилизируется  $\pi$ -электронной системой тетрапиррольного макроцикла, и регистрируется спектр  $\text{Ag}^{\text{II}}\text{TmPyP}$  аналогичный спектрам подобных соединений.<sup>[20]</sup> Сравнительно низкая реакционная способность аквакомплекса серебра в степени окисления +1, возможно, обусловлена слабым координационным взаимодействием  $\text{Ag} \rightarrow \text{N}$  в переходном состоянии взаимодействующей системы соль-порфирин.

Полученные кинетические данные дают основания полагать, что для данного порфирина в водных растворах реализуется одностадийный бимолекулярный механизм, предложенный и обоснованный для неводных органических растворителей.<sup>[21]</sup> Альтернативный двухстадийный механизм, постулирующий образование «sitting-a-top» комплекса,<sup>[22]</sup> маловероятен, так как его реализация предполагает второй кинетический порядок реакции по соли.

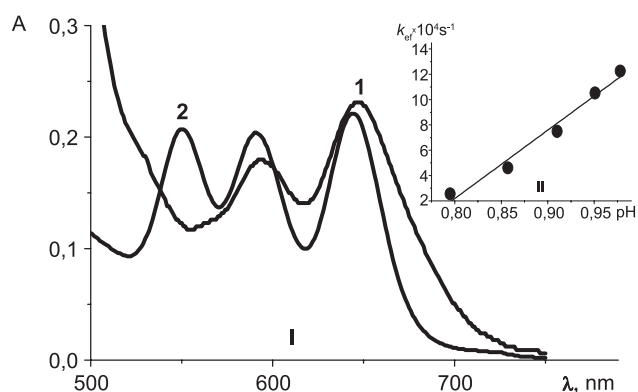
Авторы<sup>[23]</sup> при изучении реакции комплексообразования Ag(I) с водорастворимым ТМРyP предположили образование соединения состава  $\text{Ag}_2\text{TmPyP}$ , устойчи-

вость которого в протонодонорных средах очень мала, что согласуется с нашими данными.

В ЭСП AgТМРyP зарегистрированы две полосы поглощения:  $\lambda = 435$  нм ( $\lg \varepsilon = 4.56$ ) и  $\lambda = 550$  нм ( $\lg \varepsilon = 3.08$ ). Эти данные согласуются с известными из литературы сведениями для аналогичных комплексов Ag(II) с водорастворимыми порфинами.<sup>[20]</sup>

Использование металлопорфиринов как биологически активных агентов, например, при антимикробной обработке текстильных материалов, предполагает, что они должны быть устойчивы достаточно длительное время в агрессивных средах.

В слабокислых средах AgТМРyP и CuТМРyP не разрушаются, так при растворении этих металлопорфиринов в ледяной уксусной кислоте не наблюдалось изменение в ЭСП даже при нагревании. При растворении AgТРyP и CuТРyP в 98% серной кислоте наблюдалось изменение в ЭСП, и регистрировался спектр, характерный для протонированной формы порфирина (Рисунок 2(I)).



**Рисунок 2.** I) ЭСП AgТМРyP (1) – в 98% серной кислоте, (2) – водный раствор при концентрации серной кислоты 1.5 моль/л и выдерживании при 313 К в течение 12 часов; II) Изменение эффективной константы скорости демедализации AgТМРyP в зависимости от pH.

Нами проведено исследование кинетики протонирования AgТМРyP в серной кислоте при различных значениях pH (Рисунок 2(II)). Полученные кинетические данные свидетельствуют о том, что процесс диссоциации металлопорфирина даже в сильной неорганической кислоте не протекает до конца. Как видно из данных Рисунка 2(I), в ЭСП полоса поглощения AgТРyP (550 нм) проявляется даже при добавлении в водный раствор серной кислоты до концентрации 1.5 моль/л и выдерживании данного раствора в течение 12 часов при температуре 313 К, что свидетельствует о высокой стабильности AgТМРyP. Все это позволяет проводить исследо-

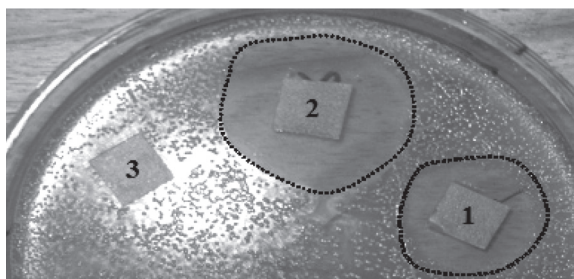
**Таблица 1.** Кинетические параметры реакции координации ТМРyP солями металлов в водном растворе.

соль	$k^{298} \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	$k \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	$k \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	$k^{298} \cdot 10^2, \text{л}/(\text{моль} \cdot \text{с})$	$\Delta E^\ddagger, \text{кДж}/\text{моль}$	$\Delta S^\ddagger, \text{Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$
$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	$36.2 \pm 0.4$	$^{288}29.1 \pm 0.4$	$^{278}18.4 \pm 0.2$	$144.3 \pm 0.6$	$24 \pm 1$	$-281 \pm 5$
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	$8.6 \pm 0.2$	$^{289}14.2 \pm 0.4$	$^{310}20.6 \pm 0.2$	$32.1 \pm 0.3$	$33 \pm 1$	$-165 \pm 5$
AgOAc	$6.1 \pm 0.4$	$^{303}9.3 \pm 0.2$	$^{308}12.1 \pm 0.2$	$24.4 \pm 0.2$	$42 \pm 1$	$-140 \pm 5$

вания биологических свойств металлопорфиринов и с уверенностью относить полученные данные именно к серебру, входящему в состав металлопорфирина.

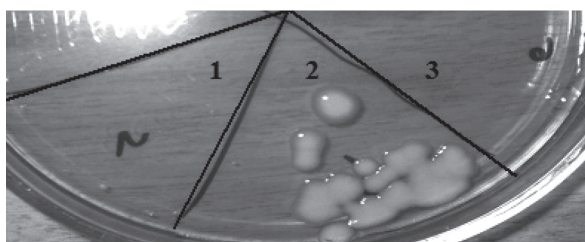
Анализ биологических свойств для исследуемых порфиринов выполнен на Грамм-положительных бактериях *Staphylococcus aureus* и Грамм-отрицательных бактериях *Escherichia coli*, а также грибах *Candida albicans* в плотных и жидких питательных средах.

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые образцы проявляют биологическую активность. AgTMPyP проявляет наиболее выраженную бактериостатическую активность в отношении тест-культуры *Staphylococcus aureus* (Рисунок 3) на плотной питательной среде (зона задержки роста 35 мм); в отношении *Escherichia coli* активность менее выражена (зона задержки роста 17 мм<sup>[24]</sup>). В жидких питательных средах все исследуемые образцы проявляют такое же бактерицидное действие, что и в плотных.



**Рисунок 3.** Рост тест-культуры *Staphylococcus aureus* на плотной питательной среде: 1) Ag(AcO); 2) AgTMPyP; 3) CuTMPyP.

Для грибов *Candida albicans* выявлено полное отсутствие роста высевов из жидкой питательной среды для всех образцов, за исключением образца CuTMPyP (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Рост тест-культуры *Candida albicans* на плотной питательной среде (высев из жидкой питательной среды): 1) Ag(AcO); 2) CuTMPyP; 3) AgTMPyP.

Очевидно, это обусловлено природой центрального катиона металла и его координационной насыщенностью. Таким образом, можно говорить о том, что AgTMPyP является достаточно эффективным биологическим агентом – ингибитором роста фирмикутных бактерий

*Staphylococcus aureus* и грациликотных бактерий *Escherichia coli* в темноте.

**Благодарности.** Синтезы порфиринов, металлокомплексов и материалов на их основе для биологических исследований выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение №14-23-00204). Кинетические исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации.

## References

1. Nemykin V.N., Polshyna A.E., Borisenkova S.A., Strelko V.V. *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2007**, *264*, 103-109.
2. Iliev V., Mihaylova A., Bilyarska L. *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2002**, *184*, 121-130.
3. Vashurin A.S., Pukhovskaya S.G., Semeikin A.S., Golubchikov O.A. *Macroheterocycles* **2012**, *5*, 72-75.
4. Hassanein M., Gerges S., Abdo M., El-Khalafy S. *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2005**, *240*, 22-26.
5. Ochoa G., Gutierrez C., Ponce I., Paez M., Pavez J., Zagal J., Silva J.F. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *639*, 88-94.
6. Kimura M., Yamaguchi Y., Koyama T. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1997**, *1*, 309-313.
7. Kurek S.S., Michorczyk P., Balisz A.-M. *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2003**, *194*, 237-248.
8. Li H.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *15*, 6298-6301.
9. Li H.-P., Fedorova O.S., Grachev A.N., Trumble W.R., Bohach G.A., Czuchajowski L. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1997**, *1354*, 252-260.
10. Phadke A.S., Morgan A.R. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1725-1728.
11. Mironov A.F., Grin M.A. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2008**, *12*, 1163-1172.
12. Han F.X., Wheelhouse R.T., Hurley L.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3561-3570.
13. Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897-3915.
14. Zheng B.-Y., Lin T., Yang H.-H., Huang J.-D. *Dyes Pigm.* **2013**, *96*, 547-553.
15. Zupán K., Egyeki M., Tóth K., Fekete A., Herényi L., Módos K., Csík G. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **2008**, *90*, 105-112.
16. Stojiljkovic I., Evavold B.D., Kumar V. *Expert Opin. Inv. Drug.* **2001**, *10*, 309-320.
17. Vodzinsky S.V., Zhilina Z.I., Petrenko N.F., Andronati S.A. *Russ. J. Org. Chem.* **1989**, *25*, 1529-1533.
18. Vashurin A., Pukhovskaya S., Kuzmicheva L., Titova Yu., Golubchikov O. *Natural Science* **2012**, *4*, 461-465.
19. Karyakin Yu.V., Angelov I.I. *Pure Chemical Reactants* Moscow: Khimiya, **1974**. 407 p. (in Russ.) [Карякин Ю.В., Ангелов И.И. *Чистые химические вещества*, М.: Химия, **1974**. 407 с.]
20. Harriman A., Richoux M.C., Neta P. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 4957-4965.
21. Berezin B.D. *Coordination Compounds of Porphyrins and Phthalocyanines*. N. Y., Toronto: J. Wiley, **1981**. 286 p.
22. Hambricht P. *Chemistry of Water Soluble Porphyrins*. In: *The Porphyrin Handbook* (Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R., Eds.), Academic Press, **2000**. Vol. 3, Ch. 18, 129-210.
23. Okoh J.M., Bowles N., Krishnamurthy M. *Polyhedron* **1984**, *3*, 1077-1081.
24. Vashurin A.S., Pukhovskaya S.G., Voronina A.A., Semeikin A.S., Golubchikov O.A. *Macroheterocycles* **2013**, *6*, 257-261.

Received revised 14.08.2014

Accepted 10.09.2014