

## Разработка синтеза дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX

А. Е. Щелкунова,<sup>a,b@</sup> Е. В. Болтухина,<sup>a</sup> В. Д. Румянцева,<sup>b,c</sup> И. П. Шилов,<sup>c</sup>  
С. Д. Каракотов<sup>a</sup>

<sup>a</sup>АО «Щелково Агрохим», 141101 Щелково, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования МИРЭА –  
Российский технологический университет, 119571 Москва, Россия

<sup>c</sup>Фрязинский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники  
и электроники им. В.А. Котельникова Российской академии наук, 141190 Фрязино, Россия

@E-mail: nova2305@mail.ru

*Предложен метод получения дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX из гемина с применением хромато-масс-спектрометрического анализа примесного состава полупродуктов. Этот комплекс является эффективным флуорофором и может стать основой для создания диагностических препаратов для различных доброкачественных и злокачественных новообразований, а также кожных патологий. Для хроматографического разделения использовали жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity с квадрупольным масс-селективным и многоволновым спектрофотометрическим детекторами. Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа представленных соединений приводятся в литературе впервые. Идентификацию веществ и их примесей проводили сравнением с теоретическими молекулярными массами. Показано, что хромато-масс-спектрометрия промежуточных технических полупродуктов в процессе синтеза позволяет значительно сократить число операций очистки на всех стадиях синтеза. Спектральные свойства комплекса изучались на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800. 4f-Люминесценция измерялась на лазерно-волоконном флуориметре для ближней инфракрасной люминесцентной диагностики (разработка ФИРЭ РАН им. Котельникова, Россия).*

**Ключевые слова:** Порфирины, гемин, иттербиевый комплекс, 4f-люминесценция, диагностика, хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрия, гель Флюроскан.

## Development of the Synthesis of 2,4-Di( $\alpha$ -methoxyethyl)-deuteroporphyrin IX Ytterbium Complex Dipotassium Salt

Anastasiya E. Shchelkunova,<sup>a,b@</sup> Ekaterina V. Boltukhina,<sup>a</sup>  
Valentina D. Rumyantseva,<sup>b,c</sup> Igor' P. Shilov,<sup>c</sup> and Salis D. Karakotov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>AO Shchelkovo Agrokhim, 141101 Shchelkovo, Russia

<sup>b</sup>MIREA – Russian Technological University, 119571 Moscow, Russia

<sup>c</sup>Fryazino Branch of the Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, 141190 Fryazino, Russia

@Corresponding author E-mail: nova2305@mail.ru

*A method for the preparation of 2,4-di( $\alpha$ -methoxyethyl)deuteroporphyrin IX ytterbium complex dipotassium salt from hemin with the use of chromatographic-mass spectrometric analysis of the impurity composition of the intermediate products is proposed. This complex is an efficient fluorophore and can become a base for the creation of diagnostic products for benign and malignant neoplasms as well as pathological skin conditions. An Agilent 1260 Infinity liquid chromatograph equipped with quadrupole mass selective and multiwave spectrophotometric detectors is used for chromatographic separation. The results of the chromatographic-mass spectrometric analysis of the presented compounds are provided for the first time. The substances and their impurities are identified by comparison with*

*the theoretical molecular weights. It is shown that the chromatographic-mass spectrometric analysis of the intermediate technical products in the course of the synthesis makes it possible to significantly decrease the number of purification operations at all the synthesis stages. The spectral properties of the complex are studied on a Shimadzu UV-1800 double-beam spectrophotometer. The 4f luminescence is measured on a laser-fiber fluorimeter for near-infrared luminescence diagnostics (the know-how of the Fryazino Branch of the Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Fryazino, Russia).*

**Keywords:** Porphyrins, hemin, ytterbium complex, 4f luminescence, diagnostics, chromatography-mass spectrometry, spectrophotometry, Fluroskan gel.

## Введение

В конце XX века при лечении онкологических заболеваний начал широко применяться метод фотодинамической терапии (ФДТ).<sup>[1]</sup> Он основан на селективном накоплении фотосенсибилизаторов в опухолевых тканях. К настоящему времени за рубежом и в нашей стране разработано несколько поколений препаратов, производимых на основе тетрапиррольных макрогетероциклов: производные порфиринов (фотофрин II, фотогем и др.), фталоцианинов (фотосенс), хлоринов (фоскан, фотодитазин, радахлорин и др.), бактериохлоринов.<sup>[2]</sup> Также выявлено, что подобные производные можно использовать и в диагностических целях. Однако соединения, демонстрирующие прекрасный фотодинамический эффект, малоперспективны в области диагностики новообразований, а также кожных патологий. Это связано с тем, что при облучении они генерируют синглетный кислород как в злокачественных, так и в здоровых тканях. После проведения сеансов ФДТ фотосенсибилизатор надолго задерживается в тканях, вызывая различные фотодерматиты.<sup>[3]</sup>

Изучение большого числа порфириновых соединений показало, что переход от свободных оснований порфиринов к их нефототоксичным металлокомплексам позволяет решить проблему фототоксических эффектов. Наиболее перспективными для диагностических целей стали комплексы порфиринов с лантанидами, в особенности с ионами иттербия.<sup>[4]</sup> Иттербиевые комплексы порфиринов показали себя эффективными диагностическими соединениями, практически не вызывающими генерацию синглетного кислорода и обладающими значительной 4f-люминесценцией в ближней ИК области спектра.

Цель работы заключалась в получении дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX как основы для создания препарата-диагностика тканей с патологическими изменениями доброкачественного или злокачественного характера. При разработке синтеза исходных соединений была проанализирована различная научная и патентная литература.<sup>[5-7]</sup> Ранее анализ полупродуктов и продуктов проводили посредством ЯМР спектроскопии образцов, очищенных с помощью колоночной хроматографии. Также использовались методы тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Для создания более технологичного метода синтеза использовался анализ всех конечных и промежуточных соединений методом хромато-масс-спектрометрии. Это позволило

значительно сократить число операций очистки на всех стадиях синтеза.

## Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие химические вещества: гемин 95 % и ацетилацетонат иттербия 99.9 % REO (abcг GmbH), 33 % раствор бромистого водорода в уксусной кислоте (ACROS ORGANICS), калия карбонат и натрия гидрокарбонат квалификации «ч» (Спектр-Хим). Все использованные в процессе синтеза растворители имели квалификацию «чда» (ЭККО-1). В процессе синтеза использовали дистиллированную воду, полученную с помощью аквадистиллятора АЭ-14-«Я-ФП»-02 (Ферропласт Медикал). Для проведения ВЭЖХ-МС анализа использовали растворители квалификации «для хроматографии» (Merck).

Для хромато-масс-спектрометрического (ВЭЖХ-МС) анализа использовали жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity, оснащенный многорежимным источником ионизации Agilent G1978B, квадрупольными масс-селективным детектором Agilent 6120 и многоволновым спектрофотометрическим детектором Agilent 1260 MWD VL (Agilent Technologies, США). Разделение проводили на колонке Altima C18 (100×2.1 мм, 5 мкм) (Люмэкс, Россия) в режиме изократического элюирования при скорости потока 0.6 мл/мин, объеме вводимой пробы 2 мкл, температуре колонки 20 °С (подвижная фаза: метанол или смесь метанол/0.1М водный раствор ацетата аммония в соотношении 70/30). Длина волны спектрофотометрического детектора составляла 400 нм. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме ионизации ESI с регистрацией положительных ионов.

Спектры поглощения были получены на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Japan) в диапазоне длин волн 350–950 нм.

Сигнал 4f-люминесценции измеряли на мультимодальном эндоскопическом лазерно-волоконном флуориметре для ближней инфракрасной люминесцентной диагностики (разработка ФИРЭ РАН им. Котельникова, Россия). Спектральный диапазон измерений: длина волны возбуждающего люминесценцию лазерного излучения – 405 нм; 4f-люминесценция регистрировалась в пределах 900–1100 нм.

Анализ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводили на пластинках TLC Silica gel 60 F 254 (Merck).

Дополнительная информация (SI) доступна на <https://macroheterocycles.isuct.ru/en/mhc190658s>.

## Результаты и их обсуждение

Синтез дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX включал три основные стадии (Рисунки 1, 2). В качестве

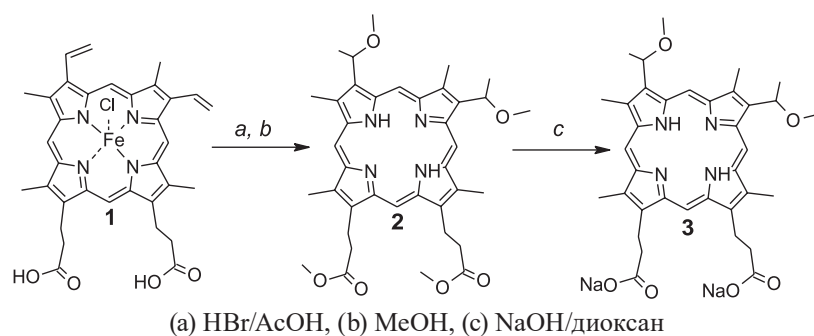
Рисунок 1. Схема синтеза 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (3).

Таблица 1. Компоненты технического ТМЭ ГП IX (2).

Время удерживания, мин*	$m/z$	Площадь, %	Формула	Идентификация соединения
0.649	627.5 [M+H] <sup>+</sup>	1.6610		ДМЭ ДП IX
0.823	641.4 [M+H] <sup>+</sup>	19.5908		1,3,5,8-тетраметил-2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)-6-(2'-метоксикарбонилэтил)-7-(2-гидроксикарбонилэтил)порфирин
1.275	655.5 [M+H] <sup>+</sup>	72.0181		ТМЭ ГП IX
2.272	623.4 [M+H] <sup>+</sup>	6.7301		1,3,5,8-тетраметил-2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)-6-(2'-метоксикарбонилэтил)-7-(2-гидроксикарбонилэтил)порфирин (и его 4,2-региоизомер)

\*Подвижная фаза: метанол

исходного соединения был выбран гемин (**1**), который выделяют из крови крупного рогатого скота.

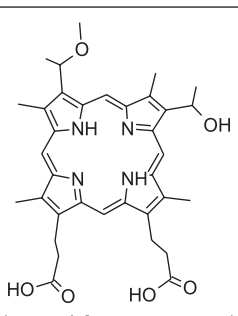
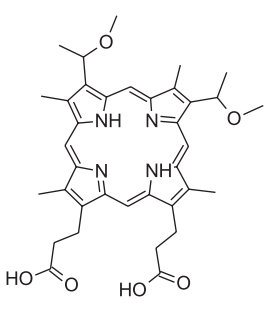
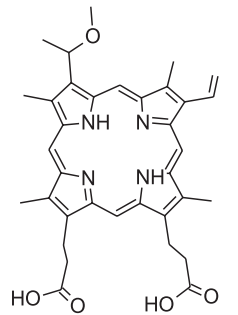
На первом этапе проводили деме­таллирование гемина действием 33 % ( $\rho = 1.42 \text{ г/см}^3$ ) раствора бромистого водорода в уксусной кислоте. Затем реакционную массу обрабатывали метанолом и получали «тетраметилловый» эфир гематопорфирина IX (ТМЭ ГП IX) (**2**).

Удаление железа из гемина контролировали с помощью спектров поглощения (Рисунок 3). Полноту прохождения реакции этерификации определяли с помощью тонкослойной хроматографии. Анализ продуктов этерификации проводили с помощью ВЭЖХ-МС анализа. Изучение данных ВЭЖХ-МС (Рисунки 1S, 2S в SI) позволило подобрать оптимальные условия для деме­таллирования и выделения соединения **2** после проведения реакции этерификации. Наилучшим способом оказалось добавление насыщенного раствора ацетата натрия к метанольному раствору ТМЭ ГП IX с последующим добавлением карбоната калия. При этом продукт получают с максимальным выходом, и он содержит минимальное количество при-

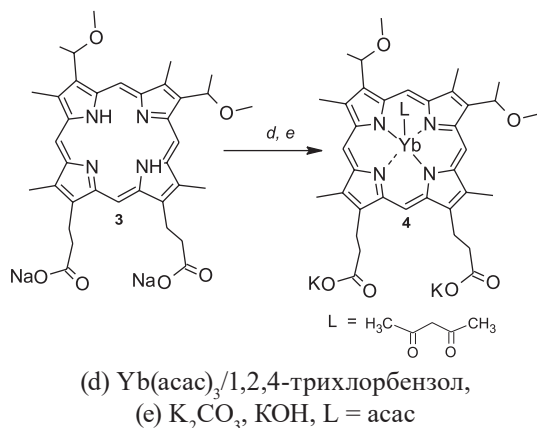
месей (Таблица 1), очистка от которых не требуется, что позволяет использовать технический продукт на следующей стадии синтеза. Ранее в патенте<sup>[8]</sup> ТМЭ ГП IX (**2**) был охарактеризован только спектрами поглощения, а хромато-масс-спектрометрический анализ, с помощью которого возможно установить наличие дополнительных примесей, не проводили.

Соединение, на основе которого планировали получать иттербиевый комплекс, должно было обладать амфифильной структурой, т.е. сочетать в себе как гидрофобные заместители, так и карбоксильные группы. Подобные вещества обладают большим сродством к опухолям.<sup>[9,10]</sup> Их натриевые и калиевые соли обладают достаточной растворимостью в воде и позволяют отказаться от применения фосфолипидов, кремофора и других поверхностно-активных веществ. Этим требованиям отвечает 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил) дейтеропорфирин IX (ДМЭ ДП IX) (**3**). Его получают щелочным гидролизом сложноэфирных групп в ТМЭ ГП IX (**2**). Контроль прохождения реакции осуществляли с помощью методов ТСХ, ВЭЖХ-МС (Рисунки

**Таблица 2.** Компоненты технического ДМЭ ДП IX (**3**).

Время удерживания, мин*	$m/z$	Площадь, %	Формула	Идентификация соединения
3.663	613.3 [M+H] <sup>+</sup>	6.2732	 (и его 4,2-региоизомер)	1,3,5,8-тетраметил-2{4}-( $\alpha$ -метоксиэтил)-4{2}-( $\alpha$ -гидроксиэтил)-6,7-ди(2'-карбоксиэтил)порфирин
7.555	627.4 [M+H] <sup>+</sup>	85.0784		ДМЭ ДП IX
19.062	595.3 [M+H] <sup>+</sup>	8.6484	 (и его 4,2-региоизомер)	1,3,5,8-тетраметил-2{4}-( $\alpha$ -метоксиэтил)-4{2}-винил-6,7-ди(2'-карбоксиэтил)порфирин

\*Подвижная фаза: смесь метанол/0.1M водный раствор ацетата аммония в соотношении 70/30



**Рисунок 2.** Схема синтеза дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (4).

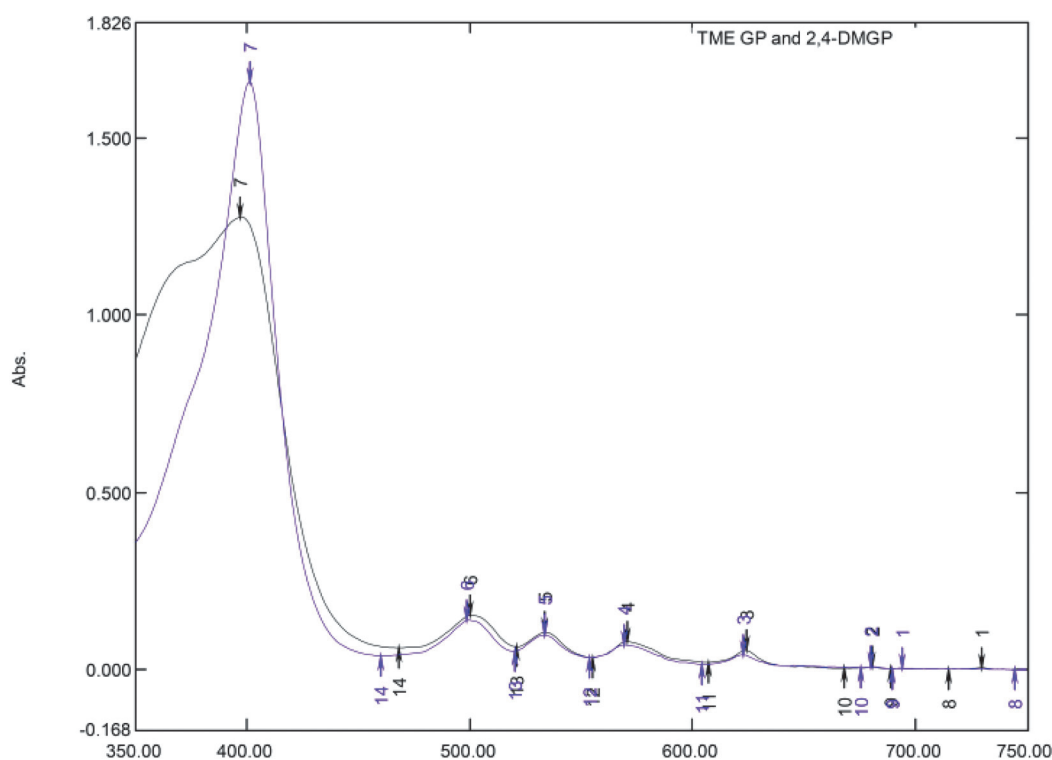
3S в SI, Таблица 2) и спектрофотометрии (Рисунок 3). Выход соединения **3** составляет 95 %.

Заключительная стадия процесса состоит во введении иона иттербия в порфириновый макроцикл **3**.

Использование иттербиевого комплекса **4** как диагностического средства, обладающего характерной люминесценцией в ближней ИК области спектра, впервые было предложено российскими учеными.<sup>[11]</sup>

Ион иттербия вводят в порфириновый макроцикл кипячением порфирина (**3**) в виде свободного основания с ацетилацетонатом иттербия в 1,2,4-трихлорбензоле. Полноту введения металла в макроцикл контролировали с помощью ТСХ в системе  $\text{CHCl}_3\text{--MeOH--H}_2\text{O} = 32:12:0.5$  и спектров поглощения (Рисунок 4). Введение металла в порфириновый макроцикл сужает полосу Соре, вызывая небольшой батохромный сдвиг в спектре, и вместо четырех полос поглощения, характерных для порфирина в виде свободного основания, появляются две Q-полосы в видимой области спектра.

Ранее при выделении иттербиевого комплекса из реакционной массы использовали хроматографическую очистку на оксиде алюминия для удаления 1,2,4-трихлорбензола, экстракцию комплекса с адсорбента смесью изопропанола с 5 %-ным водным раствором гидрокарбоната натрия. Затем полученный раствор подкисляли ледяной уксусной кислотой до pH

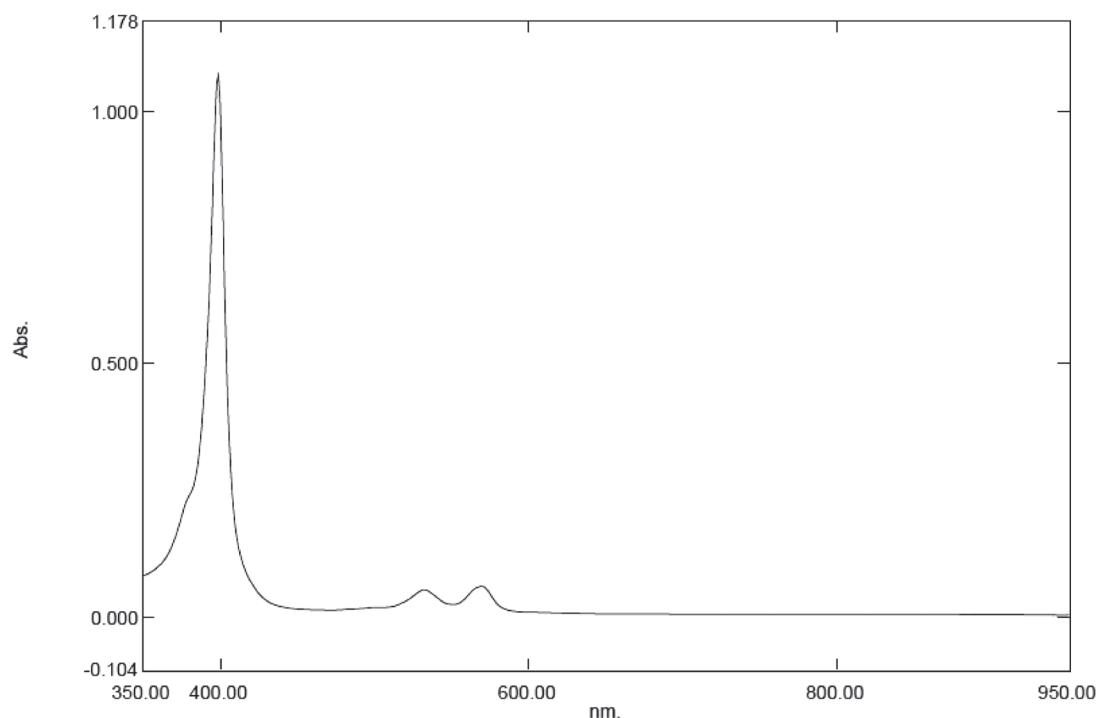


**Рисунок 3.** Электронные спектры поглощения ТМЭ ГП IX (черный) и ДМЭ ДП IX (сиреневый), хлороформ,  $10^{-5}$  М.

**Таблица 3.** Максимумы поглощения соединений **1–4** в различных растворителях.

Соединение	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	Растворитель
Гемин	424, 522, 554	Пиридин/ $\text{NaOH}+\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
ТМЭ ГП IX	403, 500, 534, 569, 623	хлороформ
ДМЭ ДП IX	396, 502, 535, 573, 625	хлороформ
$\text{Yb}(\text{acac})_3$ -2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)ДП IX	398, 535, 571	40 % ДМСО





**Рисунок 4.** Электронный спектр поглощения Yb(acac)-2,4-ДМЭ ДП IX (4), ДМСО,  $10^{-5}$  М.

6.5–7.0 и извлекали металлокомплекс из водно-спиртовой среды хлороформом.<sup>[12]</sup> Эта стадия не технологична и может приводить к разрушению комплекса при  $pH < 6.0$ .

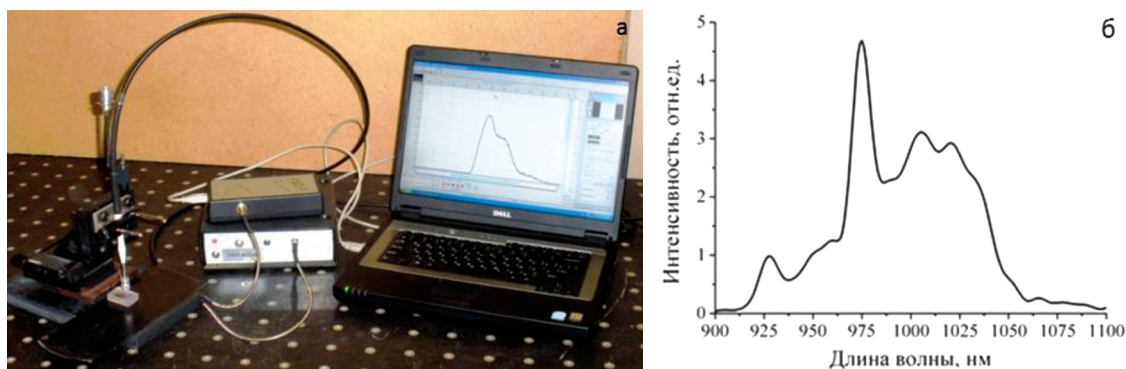
В предложенном способе иттербиевый комплекс выделяли из реакционной массы путем осаждения в гексане, затем растворяли в горячем растворе поташа с добавлением щелочи и получали его дикалиевую соль. При очистке такого водорастворимого комплекса применили новую методику с использованием отечественного сорбента СПС-Техно-ОН-3 (ООО «Техносорбент», Россия), которая позволяет одновременно проводить отделение как органических, так и неорганических примесей. Это значительно сокращает потери целевого продукта **4** и удешевляет процесс.

Строение дикалиевой соли Yb(acac)-2,4-ДМЭ ДП IX (**4**) подтверждали спектрофотометрическим мето-

дом, информативный масс-спектр данного соединения получить не удалось.

Иттербиевый комплекс (**4**) имеет высокие значения коэффициентов экстинкции, для него характерна узкая и достаточно интенсивная 4*f*-люминесценция в области ~975 нм (Рисунок 5). Время жизни 4*f*-люминесценции для соединения **4** составляет 8–10 мкс. Ранее измеряли квантовый выход инфракрасной люминесценции Yb-ДМЭ ДП IX в ДМСО (0.8 %). Было обнаружено, что молекулярный кислород не тушит люминесценцию иона металла в составе иттербиевого комплекса, что является преимуществом при использовании данного комплекса для диагностики. Среднее время жизни иона Yb<sup>3+</sup> в ДМСО составляет 9.7 мкс.<sup>[13,14]</sup>

Хорошие люминесцентные свойства, а также низкая токсичность и устойчивость позволили создать на основе иттербиевого комплекса ДМЭ ДП IX



**Рисунок 5.** Внешний вид лабораторной установки для измерения сигнала люминесценции (а) и сигнал люминесценции дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (**4**) при 975 нм (б).

(4) амфифильные композиции с различными гелями (тизол, калгель, кремофор), а также растворы на основе ДМСО.<sup>[15]</sup> В настоящее время они проходят испытания по применению в косметологии и медицине для диагностики кожных и гинекологических заболеваний, а также поражений на слизистых оболочках.

## Выводы

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа позволили оценить характер примесей, образующихся на всех стадиях синтеза дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (4) из гемина, и таким образом сделать процесс его получения более простым и технологически обоснованным.

Использование дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX и лазерно-волоконного флуориметра является перспективным направлением в ранней диагностике различных заболеваний кожи и слизистых оболочек.

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (проект №4.9596.2017/8.9).

## References

### Список литературы

1. Szaciłowski K., Macyk W., Drzewiecka-Matuszek A., Brindell M., Stochel G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647–2694.

2. Mironov A.F. *Russ. Khim. Zh.* **1998**, *XLII*(5), 23–36 (in Russ.).
3. Mironov A.F. In: *Advances in Porphyrin Chemistry*. Vol. 4 (Golubchikov O.A., Ed.), St. Petersburg, **2004**. p. 271–292 (in Russ.) [Миронов А.Ф. В кн.: *Успехи химии порфиринов*, Т. 4 (Голубчиков О.А., ред.), СПб.: BBM, **2004**. с. 271–292].
4. Ivanov A.V., Rumyantseva V.D., Shilov I.P. *Fundamental Sciences to Medicine. Biophysical Medical Technologies*, Vol. 2 (Grigor'ev A.I., Vladimirov Yu.A., Eds.), Moscow: MAKSPress, **2015**, p. 110–144 (in Russ.) [Иванов А.В., Румянцева В.Д., Шилов И.П. *Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии*. Т. 2 (Григорьев А.И., Владимиров Ю.А., ред.), М.: МАКС Пресс, **2015**. с. 110–144].
5. Mironov A.F. *Russ. Chem. Rev.* **2013**, *82*, 333–351.
6. *Lanthanides. Simple and Complex Compounds* (Minkin V.I., Ed.), Rostov-on-Don: Rostov State Univ., **1980**. 295 p. (in Russ.) [Лантаноиды. Простые и комплексные соединения (Минкин В.И., ред.), Изд-во Рост. гос. ун-та, **1980**. 295 с.].
7. RU2647588. Published on 16.03.2018 (in Russ.).
8. SU857138. Published on 23.08.1981 (in Russ.).
9. Bonnet R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, **2000**. 305 p.
10. Nakajima S., Hayashi H., Omote Y., Yamazaki Y., Hirata S., Maeda T., Kubo Y., Takemura T., Kakiuchi Y., Shindo Y., Koshimizu K., Sakata I. *J. Photochem. Photobiol., B* **1990**, *7*, 189–198.
11. Gaiduk M.I., Grigoryants V.V., Mironov A.F., Rumyantseva V.D., Chissov V.I., Sukhin G.M. *J. Photochem. Photobiol., B* **1990**, *7*, 15–20.
12. RU2411243. Published on 10.02.2011 (in Russ.).
13. Ivanov A.V., Rumyantseva V.D., Shchamkhalov K.S., Shilov I.P. *Laser Phys.* **2010**, *20*, 2056–2065.
14. Stasheuski A.S., Knyukshto V.N., Ivanov A.V., Rumyantseva V.D., Shilov I.P., Galievsky V.A., Dzhagarov B.M. *J. Appl. Spectrosc.* **2015**, *81*, 938–943.
15. RU2617045. Published on 19.04.2017 (in Russ.).

Received 03.06.2019

Accepted 09.10.2019