

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Р.Г. КАДЫРОВА, Г.Ф. КАБИРОВ, Р.Р. МУЛЛАХМЕТОВ

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ  
БИОГЕННЫХ КИСЛОТ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

МОНОГРАФИЯ

Казань 2016

УДК 24.1 : 28. 072

ББК 547.461.4 : 546.34 : 577.112.3

К13

*Рецензенты:*

доктор биологических наук Казанской государственной академии  
ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана *Юсупова Г.Р.*;

доктор химических наук, профессор Казанского государственного  
энергетического университета *Чичиров А.А.*

**К13 Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р.**

Синтез и свойства комплексных солей биогенных кислот макро-  
и микроэлементов. Монография / Р.Г. Кадырова, Г.Ф. Кабиров,  
Р.Р. Муллахметов. – Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2016. – 115 с.

**ISBN 978-5-89873-454-1**

В монографии рассмотрены вопросы, касающиеся физико-химических  
и биологических свойств биогенных кислот, синтеза комплексных солей  
субстратов щелочных, щелочноземельных металлов и двухвалентных 3d-металлов.  
Большое внимание уделено анализу биологических свойств комплексонов и их  
применению в ветеринарии и медицине. Приведены экспериментальные данные  
авторов по разработке рациональных способов получения комплексонов.

Монография рассчитана на научных работников, аспирантов, студентов  
химических и биологических специальностей.

УДК 24.1 : 28. 072

ББК 547.461.4 : 546.34 : 577.112.3

**ISBN 978-5-89873-454-1**

© Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф.,  
Муллахметов Р.Р., 2016

© Казанский государственный  
энергетический ун-т, 2016

## ВВЕДЕНИЕ

Аминокислотам и их комплексным солям биогенных металлов принадлежит большая роль в современной фармакологии.

Макро-, микроэлементы, минеральные жизненно необходимые элементы, входят в состав биологически активных соединений и генетического аппарата клеток, способствуют функционированию различных органов и тканей. Мощное воздействие макро-, микроэлементов на физиологические процессы объясняется тем, что они входят в состав ферментов, коферментов, участвующих в регуляции жизненных процессов.

Любые нарушения макро-, микроэлементного равновесия в организме нуждаются в коррекции, которая может быть осуществлена с использованием соответствующих препаратов. Наиболее перспективными и биологически доступными препаратами в этом плане являются комплексные соединения, содержащие биогенные металлы и лиганды аминокислот, кислот-метаболитов цикла Кребса, биологически активных органических кислот.

Установлен широкий спектр лечебно-профилактического действия комплексных солей биогенных металлов янтарной кислоты [1, 2], аминокислот [3] в медицине и ветеринарии.

Эффективность использования комплексных соединений аминокислот с биогенными металлами в практике животноводства подробно освещена в работах [4, 5] и в медицине в качестве лекарственных средств [6].

Органически связанные макро-, микроэлементы с  $\alpha$ -аминокислотами (хелаты) имеют высокую биологическую доступность, значительно легче усваиваются организмом, чем неорганические соединения и имеют важное значение в питании животных, а также применяются в медицинской практике. В настоящее время активно развивается медицинская фармакология – микроэлементология комплексных соединений на основе аминокислот, биогенных органических кислот и макро-, микроэлементов.

Аминокислотные хелаты макро-, микроэлементов являются единственным видом продукции, соответствующей требованиям биологически активных препаратов для восполнения микроэлементов в организме.

В последние годы активно развивается фармакология физиологически активных пептидов. В ГУНИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН проводятся фундаментальные исследования по разработке дипептидных лекарственных препаратов. Физиологически активные пептиды осуществляют глобальную регуляцию организма.

В связи с перспективностью и важностью научного направления микроэлементологии нами проведено изучение реакции комплексообразования биогенных органических кислот с макро- и микроэлементами. В качестве субстратов использованы следующие соединения: глицин, глицилглицин, 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, аскорбиновая кислота.

В качестве реагентов применялись гидроксиды или сульфаты лития, натрия, магния, кальция, марганца, железа, кобальта, меди и цинка.

Известно, что указанные субстраты являются биологически активными соединениями и используются в качестве эффективных лекарственных средств.

Глицин является нейромедиатором торможения в ЦНС. Доказана его роль как тормозного нейротрансмиттера во всех отделах ЦНС. Он оказывает седативное (успокаивающее) действие на ЦНС, обладает некоторыми ноотропными свойствами.

Глицилглицин – дипептид широко используется как составная часть некоторых лекарственных средств, например препаратов свертывания крови.

Дипептиды применяются в качестве корректоров ишемических нарушений, компонентов фармакологического питания (нутрицевтиков) в онкологической практике, лекарственных препаратов с ноотропными свойствами.

4-Гидроксипролин является основным компонентом коллагена, который находится во внеклеточном матриксе соединительной ткани и поддерживает целостность тканей, механическую прочность связок и эластичность кожи.

4-Гидроксипролин не только «строительный блок» коллагена, но важное биологически активное соединение в синтезе эффективных лекарственных препаратов.

$\gamma$ -Аминомасляная кислота (ГАМК) – заменимая аминокислота, находится в основном в человеческом мозге. Она рассматривается как ингибирующий нейромедиатор, регулирующий деятельность мозга и нервных клеток, путем снижения числа сгорающих в мозге нейронов. ГАМК можно назвать «натуральным успокаивающим мозг агентом».

На основе ГАМК создан ряд лекарственных препаратов. Например, аминалон, применяемый при нарушениях мозгового кровообращения после инсульта, потери памяти, при лечении нервных психических заболеваний; фенибут – транквилизатор; пантогам – ноотропный препарат с широким клиническим применением.

Аскорбиновая кислота (витамин С) – мощный антиоксидант. Функции аскорбиновой кислоты в организме очень многообразны и связаны с ее важнейшим химическим свойством – способностью к окислительно-восстановительным реакциям.

Аскорбиновая кислота активизирует синтез коллагена, оказывает защитное действие на компоненты клетки от свободных радикалов, способствует здоровому функционированию митохондрий, стимулирует иммунную систему.

Аскорбиновая кислота проявляет антиканцерогенные свойства, так как обладает способностью обезвреживать химические канцерогены, ингибировать свободно-радикальные процессы, ведущие к развитию рака.

Из анализа литературных данных следует, что комплексоны субстратов биогенных органических кислот щелочных, щелочноземельных металлов, двухвалентных *3d*-металлов являются эффективными лекарственными средствами.

Однако в литературе недостаточно сведений по методам их синтеза. В отдельных случаях приводятся лишь краткие сообщения о получении комплексонов или предлагаются нетехнологичные методики.

С целью расширения области применения перспективных биологически активных комплексонов в ветеринарии и медицине нами проведены экспериментальные исследования по разработке рациональных методов получения соединений, выделению в индивидуальном виде и изучению их физико-химических свойств.

Монография включает 6 глав. Каждая глава содержит обзор литературных сведений и экспериментальные исследования авторов по разделам: физико-химические и биологические свойства субстрата, синтез комплексных солей щелочных и щелочноземельных металлов и их свойства, синтез комплексных солей двухвалентных *3d*-металлов и их свойства.

## ГЛАВА 1. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ ГЛИЦИНА

### 1.1. Физико-химические и биологические свойства глицина

Глицин –  $\alpha$ -аминоуксусная кислота,  $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ .

Брутто формула  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$ .

Молекулярная масса 75.07.

Бесцветные кристаллы. Температура плавления  $292^\circ\text{C}$ . Растворимость в воде при  $25^\circ\text{C}$  г/ 100 мл – 25,0, нерастворим в спирте, эфире. Водный раствор имеет почти нейтральную реакцию.

Изоэлектрическая точка  $pI$  (pH) 5,97 (6,0) при  $25^\circ\text{C}$ . Константы диссоциации ( $25^\circ\text{C}$ ):  $K_{\text{кисл.}} = 1,5 \cdot 10^{-10}$ ,  $K_{\text{осн.}} = 1,7 \cdot 10^{-12}$ ;  $pK_1$  2,34;  $pK_2$  9.60.

Глицин протеиногенная оптически неактивная заменимая  $\alpha$ -аминокислота. Входит в состав белков растительного и животного происхождения. В жидкостях и тканях может находиться в свободном состоянии.

Глицин является составной частью некоторых биологически активных соединений (глутатиона), антибиотиков, нейропептидов. Глицин содержится в составе муреина, клеточных стенок бактерий. Впервые глицин выделен из желатина в 1820 году.

В организме глицин является исходным веществом для синтеза заменимых аминокислот, а также донором аминогруппы при синтезе гемоглобина и других веществ. Вместе с другими аминокислотами глицин входит в состав полипептидной цепи, формирующей первичную структуру всех белков [7].

Глицин используется в качестве «строительного блока» в биосинтезе пуриновых колец, протопорфирина, непосредственного предшественника гема и хлорофилла.

Глицин является центральной нейромедиаторной кислотой, проявляет двоякое действие. Условно процессы, активируемые глицином в клетках, можно разделить на рецепторные и общеметаболические. Глициновые рецепторы имеются во многих участках головного и спинного мозга. Связываясь с рецепторами, глицин вызывает «тормозящее» воздействие на нейроны, при этом уменьшается выделение из нейронов «возбуждающих» аминокислот, таких, как глутаминовая кислота, повышается выделение  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Доказана роль глицина как тормозного нейротрансмиттера во всех отделах ЦНС.

ГАМК и глицин являются равноценными нейротрансмиттерами, обеспечивающими защитное торможение в ЦНС, роль которого возрастает в условиях повышенного выброса глутамата. Ингибирующие свойства глицин проявляет посредством взаимодействия не только с собственными глициновыми рецепторами, но и с рецепторами ГАМК.

Наряду с нейротрансмиттерным действием глицин обладает также общеметаболическим действием, связывает низкомолекулярные токсичные продукты в больших количествах, образующиеся в процессе ишемии.

Глицин оказывает седативное (успокаивающее) действие на ЦНС, мягкое транквилизирующее (противотревожное) и слабое антидепрессивное действие, уменьшает чувство тревоги, страха, психоэмоционального напряжения.

Глицин обладает некоторыми ноотропными свойствами. Препарат глицин рекомендуется для повышения умственной работоспособности, при стрессах, снижения памяти [8].

## **1.2. Синтез комплексных солей глицина щелочных и щелочноземельных металлов (лития, магния, кальция) и их свойства**

Аминокислоты нашли применение в качестве лекарственных средств в современной фармакологии. Глицин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты являются нейромедиаторами: глицин во вставочных нейронах спинного мозга, аспарагиновая кислота в нейронах коры головного мозга, глутаминовая кислота в нейронах мозжечка и спинного мозга. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты вызывают возбуждающие ответы, а глицин – тормозящие [9].

Данные  $\alpha$ -аминокислоты используют при лечении центральной нервной системы, а также в комплексной терапии нарушений мозгового кровообращения.

Перспективными в этом плане лекарственными средствами являются соли лития  $\alpha$ -аминокислот. Они обладают способностью купировать острое маниакальное возбуждение у психических больных и предупреждать аффективные приступы [10].

Предложено фармацевтическое средство, содержащее в том числе соли лития  $\alpha$ -аминокислот: глицинат и аспарагинат лития. Средство используется для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний из группы: ишемический и геморрагический инсульт головного мозга, спинальный инсульт, тромбоэмболические заболевания сосудов, последствия черепно-мозговых травм [11].

Изучено влияние солей лития аминокислот на сохранность и продуктивность сельскохозяйственных животных. Показано, что лития глицинат, повышая устойчивость организма птицы под действием стресс-фактора, нормализует статус птицы путем воздействия на гипоталамогипофизарную систему. При применении лития глицината повышается содержание гемоглобина и эритроцитов в крови. Применение лития глицината в рационе питания птицы способствует повышению их продуктивности и улучшению качества продукции. Сравнительный анализ экспериментальных данных по применению лития карбоната и лития глицината показал, что наибольшее положительное влияние оказывает лития глицинат, который рекомендован в качестве стресс-протектора на птицефабриках [12].

Магниевые и кальциевые соли  $\alpha$ -аминокислот являются соединениями с широким спектром биологического действия. Они нашли самостоятельное применение в качестве лекарственных средств.

Глицинат магния («Маг. глицинат») – новый активный хелат аминокислоты, который повышает абсорбцию и толерантность кишечника к магнию. Поддерживает нормальный уровень АТФ (энергии) и играет важную роль в биосинтезе, росте и термогенезе, также как и в минерализации костей и перистальтике кишечника. Способствует расслаблению мышц и нервной трансмиссии. Препарат «Chela-Mag B6 Forte» награжден золотой медалью ALBiON, содержит самую легкую усвояемую форму магния: аминокислотный хелат (бис-глицинат магния) в увеличенной дозировке (1390 мг хелата магния в одной капсуле). Дополнительно препарат обогащен витамином  $B_6$ , который совместно с магнием принимает участие в метаболических процессах. Оказывает успокоительное действие, повышает адаптационные способности организма.

Хелатный комплекс магния (состав: глицин 15 %, магний 5 %, вода до 100 %) жидкость, которая используется в качестве источника макроэлемента магния.

Магний – важный внутрикомплексный катион, самый важный минерал для сердца. Входит в состав большого количества ферментов ( $\approx 300$ ). Магний обеспечивает надлежащее функционирование нервной системы мышц и поддержание соответствующих психических функций.

Хелатный комплекс магния с глицином используется для повышения продуктивности всех видов животных и птицы.

Глицинат магния применяют для лечения аутизма у детей. Наиболее усвояемая форма 200–400 мг в день. Ионы магния активизируют ряд энзимных систем, снижают уровень катехоламинов в крови, оказывают



протективное действие на клеточные мембраны в адвентции коронарных сосудов, а также на реологические свойства крови, что способствует предупреждению атеросклероза [13].

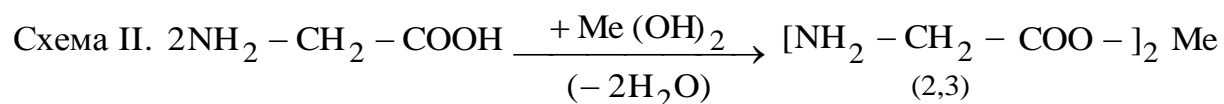
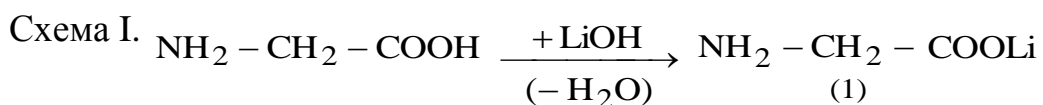
В настоящее время единственным видом продукции, по-настоящему соответствующим требованиям биологически активных препаратов для восполнения кальция нового поколения, является аминокислотный хелат кальция. Регулярное употребление аминокислотного хелата кальция позволяет создать в организме «хранилище костного кальция», которое, в соответствии с потребностями организма, непрерывно выделяет ионы кальция [3]. В эксперименте на крысах исследована возможность применения глицината кальция в качестве препарата для направления транспортировки кальция в костную ткань. Показана его эффективность и высокая биодоступность по сравнению с хлоридом кальция [14].

В исследованиях на мышцах показана возможность применения глицината кальция для восполнения дефицита кальция в условиях антиортостатической гипокинезии [15].

Из анализа литературных данных следует, что соли глицина лития, магния, кальция являются эффективными лекарственными средствами. В доступной литературе отсутствуют сведения о синтезе химически чистых солей.

С целью расширения области применения солей в медицинской и ветеринарной практике нами проведены экспериментальные исследования по разработке рациональных способов получения химически чистых препаратов [16, 17].

Сущность способа получения солей глицина лития, магния, кальция заключается в действии на водный раствор глицина гидроксидами соответствующих металлов. Реакции протекают по схемам (I. II).



где  $\text{Me} = \text{Mg}^{2+}$  (2),  $\text{Ca}^{2+}$  (3).

Способ получения солей основан на классической реакции нейтрализации. Отработаны оптимальные условия их синтеза. Показано, что выхода целевых продуктов зависят от следующих факторов: растворимости в водной среде реагента, температуры и времени реакции.

Синтез глицината лития осуществляется в гомогенной среде, температура реакции 40 °С, время 20 минут с последующей выдержкой при комнатной температуре в течение одного часа. Выход продукта составляет 83,3 %.

Глицинаты магния и кальция получают в оптимальных условиях: температура реакции 90–95 °С, время 35–40 минут. Невступившие в реакцию гидроксиды фильтруют, гомогенные растворы фильтратов упаривают с последующим выделением целевых продуктов. Выход глицината магния составляет (72, 23 %), глицината кальция (76, 20 %). Для подтверждения структуры полученных солей проведены качественные реакции. Соединения (1–3) дают качественную реакцию на аминогруппу: с хлоридом железа (II) образуются хелаты красного цвета, с сульфатом меди (II) с добавлением ацетата натрия – хелаты ярко синего цвета. Глицинат магния с гидроксидом натрия образует осадок  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , глицинат кальция с оксалатом аммония дает осадок оксалата кальция –  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .

### **Методики синтеза комплексных солей глицина лития, магния, кальция**

Для синтеза солей были использованы следующие реактивы: глицин (аминоуксусная кислота), содержание основного вещества 98,5–100 % производства ЗАО «ЛенРеактив», гидроксиды лития, магния, кальция марки «хч».

#### **1. Синтез глицината лития**

К раствору 5 г (0,066 моль) глицина в 20 мл воды прибавляют порциями 2,77 г (0,066 моль) гидроксида лития –  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Наблюдается разогрев реакционной массы до 30 °С. Гомогенный раствор нагревают при 40 °С 20 минут, выдерживают при комнатной температуре в течение одного часа и упаривают. Вязкую массу охлаждают, промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 6,5 г (83, 30 %) глицината лития дигидрата  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]\text{Li} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицинат лития дигидрат – белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 198 °С наблюдается начало разложения.

## **2. Синтез глицината магния**

К раствору 3,7 г (0,05 моль) глицина в 15 мл воды при 80 °С прибавляют 1,45 г (0,025 моль) гидроксида магния. Реакционную смесь нагревают при 90–95 °С в течение 35–40 минут. Небольшой осадок  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  фильтруют, гомогенный реакционный фильтрат упаривают. Кристаллический остаток промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 3,8 г (72,23 %) глицината магния дигидрата,  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Mg} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицинат магния дигидрат кристаллический продукт белого цвета с бирюзовым оттенком. При температуре 180 °С происходит дегидратация и образование высокоплавкого белого порошка. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне.

## **3. Синтез глицината кальция**

К раствору 5 г (0,066 моль) глицина в 20 мл воды при 80–85 °С прибавляют порциями 2,4 г (0,033 моль) гидроксида кальция. Реакционную смесь нагревают при 90–95 °С в течение 40 минут. Небольшой осадок гидроксида кальция, невступивший в реакцию, фильтруют. Гомогенный раствор фильтрата упаривают. Кристаллический остаток промывают спиртом, сушат при комнатной температуре. Получают 4,8 г (76,20 %) глицината кальция  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Ca}$ .

Глицинат кальция – белый кристаллический порошок. Хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 160 °С обугливается.

Данные анализов комплексных солей глицина щелочных и щелочно-земельных металлов приведены в табл. 1.

На основе экспериментальных исследований разработаны рациональные способы получения химически чистых глицинатов лития, магния, кальция. Показано, что способ их получения отличается технологичностью и основан на классической реакции нейтрализации. В оптимальных условиях целевые продукты получают с выходами более 70 %, что позволяет приготовить их в количествах, необходимых для использования в качестве лекарственных средств.

### **1.3. Синтез комплексных солей глицина двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства**

$\alpha$ -Аминокислоты и их комплексные соли микроэлементов характеризуются высокой биологической доступностью и имеют важное значение в питании животных, а также применяются в медицинской практике (микроэлементология).

Глицинат марганца в хелатной форме широко известный препарат. Его успешно используют в составе витаминно-минерального комплекса. Глицинат марганца помогает укреплять стенки артерий, предотвращает развитие атеросклероза, отвечает за выработку супероксиддисмутазы – фермента, который защищает клетки нашего организма от неблагоприятного воздействия свободных радикалов. Глицинат марганца необходим также для нормального функционирования мозга, для выработки энергии, синтеза нуклеотидов и холестерина. Широко известны его антиоксидантные свойства. Лучше всего он усваивается с препаратом меди и цинка [3].

Экспериментально доказано, что глицинат марганца принадлежит к IV группе по степени токсичности. ЛД<sub>50</sub> составляет более 5500 мг/кг массы тела (мыши). Для сравнения, сульфат марганца имеет ЛД<sub>100</sub> 305 мг/кг.

Введение крысам в течение 42 суток глицината марганца обеспечивает стабильные значения клинико-гематологических показателей, метаболического статуса. Глицинат марганца не накапливается в печени животных, способствует повышению щелочно-фосфатазной и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазной активности слизистой оболочки тонкого кишечника, амилазной и липазной активности поджелудочной железы.

Кормление цыплят-бройлеров комбикормами, содержащими глицинат марганца, способствует повышению активности ферментов слизистой оболочки тонкого кишечника и печени при стабильных значениях гематологических показателей и способствует увеличению среднесуточных привесов массы тела птицы [18]. Глицинат железа (ЭкоТрэйс Fe 20 %) – органическое соединение железа, служит источником железа для всех видов сельскохозяйственных животных и птицы. Он максимально используется организмом благодаря своей высокой биодоступности. В отличие от неорганических источников железа препарат не образует в ЖКТ нерастворимых соединений. ЭкоТрэйс Fe 20 % применяют для обогащения и балансирования рационов для животных и птицы по железу.

Оптимальные доли железа в рационах предотвращают развитие анемии. ЭкоТрэйс Fe 20 % вводят в комбикорма в целях профилактики и лечения микроэлементоза железа у животных.

Глицинаты марганца, железа, меди, цинка – кормовая добавка В-TRAXIM 2С, новое поколение органических микроэлементов с высоким содержанием металла, применяются для балансирования рационов животных и птицы по содержанию микроэлементов.

B-TRAXIM 2C Mn 220 – содержит 22 % органического марганца. Марганец оказывает непосредственное влияние на рост, размножение, кроветворение, функцию эндокринных органов, принимает активное участие в окислительно-восстановительных процессах, тканевом дыхании, костеобразовании, противодействует жировой дегенерации печени.

B-TRAXIM 2C Fe 220 содержит 22 % органического железа. Железо (II) участвует в окислительно-восстановительных процессах, является важным элементом для образования гемоглобина. При недостатке железа происходит исхудание, задержка роста, снижение репродуктивных функций [3].

Медные и цинковые соли глицина являются биологически активными веществами, имеющими важное значение в жизни человека и питании животных.

Медная соль глицина положительно действует на функцию кроветворных органов, поднимает уровень гемоглобина, содержание эритроцитов. Препарат применяется в качестве добавки к комбикормам для кур, овец, свиней, восполняющий в рационах дефицит глицина и меди [Отечественные ветеринарные препараты. Биологическая роль]. Хелатные соединения глицина с цинком обладают более высокой биологической доступностью для молодняка свиней и птицы по сравнению с сульфатом цинка.

В препаратах цинк должен быть обязательно в сочетании с органической молекулой, например с аминокислотой (цинк глицинат, цинк метионинат) в хелатной форме, как в «Трансфер Факторе Плюс». Это естественная форма, легко усваиваемая организмом и не создающая конкуренции другим микроэлементам при усвоении.

Цинк и медь – конкуренты, если они потребляются не в хелатной форме [3].

Координационные соединения цинка являются наиболее эффективными препаратами, обладающими бактериостатической активностью в отношении «*M. tuberculosis*». Разработана фармацевтическая композиция, содержащая глицин, сульфат цинка, воду. Экспериментально подтверждено ее лечебно-профилактическое действие при инфицировании лабораторных животных микобактериями туберкулеза [19].

Комплексонаты  $\alpha$ -аминокислот с ионами  $\text{Co}^{2+}$  обладают широким спектром биологического действия и применяются в животноводстве [5]. Кобальт относится к числу важнейших микроэлементов, входит в группу жизненно необходимых микроэлементов для человека и животных. Он участвует в кроветворении, играет роль активатора ферментов в обмене веществ.

Комплексные соли глицина двухвалентных 3d-металлов обладают высокой биологической доступностью и являются перспективными лечебными препаратами.

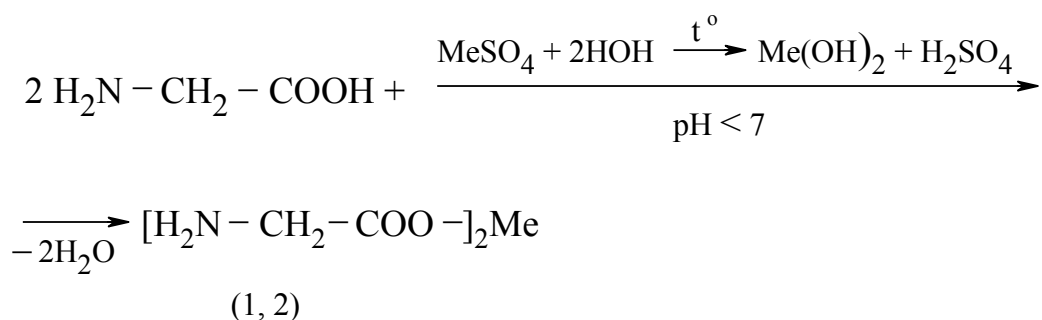
В доступной литературе имеются малочисленные сведения о методах получения комплексонов глицина микроэлементов. Сообщается о получении глицината марганца (II), с выходом 75 % при температуре реакции 100 °С [18]; глицината железа (II) из глицина и сульфата железа (II) в процессе гидролиза последнего [Эко Трейс Fe 20 %]. Однако, методики синтеза и выделения чистых препаратов в указанных источниках не приведены.

Практически отсутствуют сведения по методам синтеза комплексонов глицина кобальта, меди, цинка.

С целью использования комплексонов глицина с микроэлементами в ветеринарии и медицине нами проведены экспериментальные исследования по разработке технологичных способов получения химически чистых препаратов [20–22].

Глициваты марганца (II) и железа (II) получают действием глицина на реакционный водный раствор гидролизатов соответствующих сульфатов в кислой среде (pH 2–3).

Реакция протекает по схеме:



где Me = Mn<sup>2+</sup> (1); Fe<sup>2+</sup> (2).

Глициваты марганца (II) (1) и железа (II) (2) с высокими выходами (7,560; 85,0 %) получают следующим образом: первоначально проводят гидролиз сульфатов в водной среде (pH 2–3), а затем присыпают субстрат-кристаллический глицин. В процессе гидролиза сульфатов образуются гидроксид марганца (II) – Mn(OH)<sub>2</sub> и гидроксид железа (II) Fe(OH)<sub>2</sub>, которые хорошо растворимы в кислой среде и не подвергаются окислению. Глицин также хорошо растворим в воде и реакция протекает

в гомогенной фазе. При этом используется минимальное количество воды (растворителя) для реакции, чтобы создать условия выпадения кристаллов целевых продуктов из реакционной смеси.

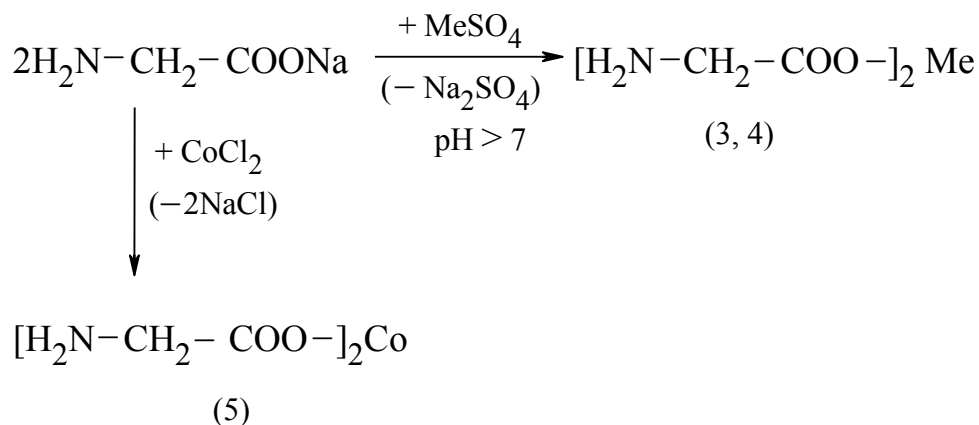
В щелочной среде образование глицинатов марганца (II) и железа (II) затруднено, так как гидроксиды Mn (II) и Fe (II) в щелочных растворах не растворяются и быстро подвергаются окислению до  $\text{MnO}(\text{OH})_2$  и  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , соответственно.

Глицинаты марганца (II), железа (II) – высокоплавкие кристаллические продукты. Глицинат марганца (II) имеет розовый оттенок, хорошо растворяется в воде. Глицинат железа (II) имеет желтоватый цвет, частично растворяется в воде.

Медные, цинковые соли глицина получают действием сульфата соответствующего металла (присыпание кристаллического реагента) на гомогенную реакционную смесь глицина и гидроксида натрия в водной среде.

При синтезе глицината кобальта (II) в качестве реагента используют  $\text{CoCl}_2$ .

Реакция протекает по схеме:



где  $\text{Me} = \text{Cu}^{2+}$  (3),  $\text{Zn}^{2+}$  (4).

Оптимальные условия синтеза глицинатов (3, 4): температура реакции 50–60 °С, время 20 минут, гомогенная реакционная среда ( $\text{pH} > 7$ ). В мягких условиях реакции получают глицинаты высокой степени чистоты с выходами: 95,5 % (3), 89,0 % (4).

Показано, что разработанный нами ранее [23] способ получения комплексонов янтарной кислоты с биогенными металлами легко моделируется на примере  $\alpha$ -аминокислот и является общим способом.

Оптимальные условия синтеза глицината кобальта (II) (5): гомогенная реакционная среда ( $\text{pH} > 7$ ), выдержка при комнатной температуре в течение двух часов. Выход целевого продукта 86,42 %. Глицинаты меди, цинка, кобальта высокоплавкие кристаллические продукты. Глицинат меди (II) частично растворяется в воде, цинка – не растворяется в воде, кобальта (II) – хорошо растворяется в воде.

Для подтверждения структуры полученных глицинатов проведены качественные реакции на  $\text{NH}_2$ -группу: соединения (1, 2, 4, 5) с хлоридом железа (III) образуют хелаты красного цвета, с сульфатом меди (II) с добавлением ацетата натрия – хелаты ярко синего цвета. При действии на глицинат марганца (II) гидроксидом натрия выпадает обильный осадок  $\text{Mn}(\text{OH})_2$  бледно-розового цвета. Глицинат железа (II) с  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образует  $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$  – темно-синий осадок турибулевой сини. Глицинат кобальта (II) с гидроксидом натрия дает осадок  $\text{Co}(\text{OH})_2$  розового цвета, который быстро окисляется в  $\text{Co}(\text{OH})_3$  – осадок бурого цвета.

### **Методики синтеза комплексных солей глицина марганца, железа, кобальта, меди, цинка**

#### **1. Синтез глицината марганца (II).**

Раствор 7,9 г (0,033 моль) сульфата марганца (II),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 20–25 мл воды ( $\text{pH} \ 3$ ) нагревают до 45–50 °С минут. К гомогенному раствору гидролизата ( $\text{pH} \ 2$ ) присыпают порциями 5 г (0,066 моль) глицина и выдерживают 30–35 минут при 45–50 °С ( $\text{pH}$  реакционного раствора 6–6,5). Затем реакционную смесь охлаждают до 10 °С, выпавший кристаллический продукт фильтруют, промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 6,0 г (75,60 %) глицината марганца (II) дигидрата,  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Mn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Глицинат марганца (II) – высокоплавкий кристаллический продукт белого цвета с розовым оттенком, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне.

#### **2. Синтез глицината железа (II).**

Раствор 9,2 г (0,033 моль) сульфата железа (II),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 20–25 мл воды ( $\text{pH} \ 3$ ) нагревают до 40–45 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата ( $\text{pH} \ 2$ ) присыпают порциями 5 г (0,066 моль) глицина и выдерживают 30–35 минут при 45–50 °С. Реакционную смесь охлаждают до 10 °С, выпавший кристаллический продукт фильтруют, промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 6,8 г (85,0 %)



глицината железа (II) дигидрата  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Глицинат железа (II) – высокоплавкий кристаллический продукт желтоватого цвета, частично растворим в воде, не растворим в спирте, ацетоне.

### **3. Синтез глицината меди (II).**

К раствору 5 г (0,066 моль) глицина в 35 мл воды прибавляют 2,64 г (0,066 моль) гидроксида натрия. При этом температура реакционной смеси поднимается до 35 °С, выдерживают 10 минут и нагревают до 60 °С. К гомогенному раствору прибавляют по частям при перемешивании 8,2 г (0,033 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и выдерживают 20–25 минут при температуре 55–60 °С. Затем реакционную смесь охлаждают до 10 °С, выпавший обильный кристаллический продукт ярко синего цвета фильтруют, промывают холодной водой от сульфатов (качественный контроль с  $\text{BaCl}_2$ ), спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 7,6 г (93,60 %) глицината меди (II) дигидрата  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Глицинат меди (II) – высокоплавкий кристаллический продукт ярко синего цвета, частично растворяется в воде при нагревании до 80 °С, не растворяется в спирте, ацетоне.

### **4. Синтез глицината цинка.**

К раствору 5 г (0,066 моль) глицина в 30 мл воды прибавляют 2,64 г (0,066 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 35 °С, выдерживают 10 минут и нагревают до 60 °С. К гомогенному раствору присыпают небольшими порциями 9,5 г (0,033 моль) сульфата цинка,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  при перемешивании и выдерживают 20–25 минут при температуре 55–60 °С. Затем реакционную смесь охлаждают до 10 °С, выпавшие кристаллы белого цвета фильтруют, промывают холодной водой от сульфатов (качественный контроль с  $\text{BaCl}_2$ ), спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 7,1 г (89,0 %) глицината цинка дигидрата,  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Глицинат цинка – высокоплавкий кристаллический продукт белого цвета, не растворяется в воде, спирте, ацетоне.

### **5. Синтез глицината кобальта (II).**

К раствору 5 г (0,066 моль) глицина в 30 мл воды прибавляют 2,64 г (0,066 моль) гидроксида натрия. Наблюдается повышение температуры реакционной смеси до 35 °С, выдерживают 10 минут. К гомогенному раствору присыпают порциями 7,8 г (0,033 моль) хлорида кобальта (II),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и выдерживают при комнатной температуре в течение двух

часов. Затем реакционный раствор упаривают, кристаллический остаток несколько раз промывают спиртом и сушат. Получают 7,1 г (86,42 %) глицината кобальта (II) дигидрата,  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}]_2\text{Co} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Глицинат кобальта (II) дигидрат – кристаллический высокоплавкий продукт темно-вишневого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне.

В результате проведенных экспериментов изучена реакция комплексообразования глицина с *3d*-биогенными металлами и синтезированы комплексонаты глицина. Выявлены факторы, влияющие на течение процесса: pH среды, гомогенность реакционной смеси, температура. В оптимальных условиях глицинаты марганца, железа (pH < 7) и меди, цинка, кобальта (pH > 7) получают с высокими выходами. Способ их получения отличается технологичностью и позволяет приготовить химически чистые целевые продукты в количествах, необходимых для широкого исследования биологической активности. Данные анализов комплексных солей глицина двухвалентных *3d*-металлов приведены в табл. 1.

Таблица 1

## Данные анализов комплексных солей глицина

№ соединения	Брутто формула	Название соединения	Выход %	Содержание % N		Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
				Найдено	Вычислено				
1.2 1.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N]Li · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат лития дигидрат	83,30	12,00	11,93	Белый	198 (разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na
1.2 2.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Mg · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат магния дигидрат	72,23	13,38	13,46	Бирюзовый	180 (разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Mg <sup>2+</sup> (NaOH)
1.2 3.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Ca · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат кальция дигидрат	76,20	14,61	14,73	Белый	160 (разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Ca <sup>2+</sup> ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )
1.3 1.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Mn · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат марганца дигидрат	75,60	11,60	11,72	Розовый	200 (обуг.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Mn <sup>2+</sup> (NaOH)
1.3 2.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Fe · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат железа дигидрат	85,00	11,52	11,66	Желтый	< 200	ч. р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Fe <sup>2+</sup> (K <sub>3</sub> [Fe(CN)] <sub>6</sub> )
1.3 3.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Cu · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат меди дигидрат	93,50	11,21	11,30	Ярко-синий	< 200	ч. р	—
1.3 4.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Zn · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат цинка дигидрат	89,00	11,12	11,24	белый	< 200	н.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na
1.3 5.	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Co · 2H <sub>2</sub> O	Глицинат кобальта дигидрат	86,42	11,59	11,47	Темно-вишневый	194 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Co <sup>2+</sup> (NaOH)

Сокращения: разл. – разложение; обуг. – обугливание; н. разл. – начало разложения; х.р. – хорошо растворяется; ч. р. – частично растворяется; н.р. не растворяется.

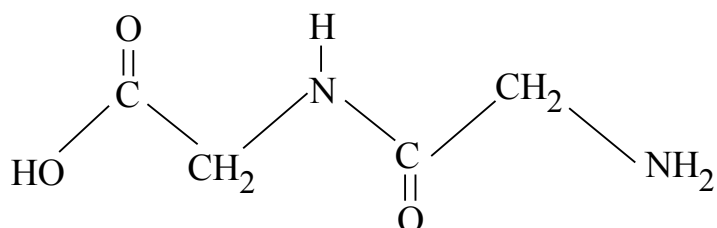
## ГЛАВА 2. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ ГЛИЦИЛГЛИЦИНА

### 2.1. Физико-химические и биологические свойства глицилглицина

Глицилглицин – простейший дипептид. Синонимы – N – глицилглицин, диглицин, Gly – Gly.

Брутто формула –  $C_4H_8N_2O_3$

Структурная формула



Mm = 132,12, белые кристаллы;

Температура плавления (°C) – 260–262;

Температура разложения (°C) – 262;

Растворимость (г / 100 г воды) – 18, 48 (25 °C);

pH раствора (5 г / 100 г воды) – 5,5 ÷ 6,0.

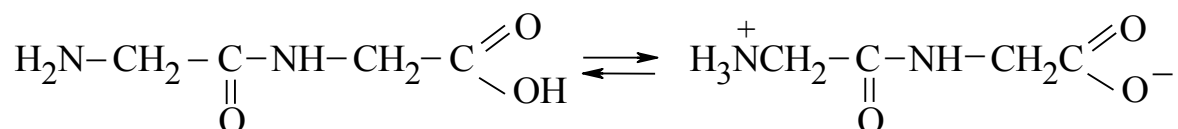
Показатели диссоциации: pKa<sub>1</sub> 3,125; pKa<sub>2</sub> 8,252 (25 °C, вода)

Изоэлектрическая точка – pI 5,70

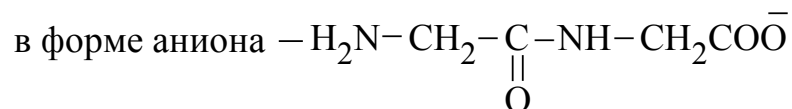
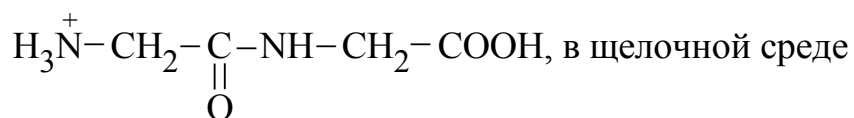
Стандартная энтальпия образования –  $\Delta H_{\text{обр}} = 747,7 \text{ (г)} \frac{\text{КДж}}{\text{моль}}$  (298 K);

Стандартная свободная энергия образования –  $488 \frac{\text{КДж.}}{\text{моль}}$  [24].

Глицилглицин обладает амфотерными свойствами и существует в водном растворе в виде биполярного иона:



Для биполярного иона характерны два типа реакций кислотно-основного взаимодействия: в кислой среде он находится в форме катиона:



### ***Биологические свойства пептидов***

В последние годы активно развивается фармакология физиологически активных пептидов. Выделено и изучено несколько сотен природных пептидов, которые играют самостоятельную физиологическую роль. Пептидные антибиотики синтезируются микроорганизмами. Например, грамицидин –S, в состав которого входят остатки аминокислот – орнитина и D-изомеры фенилаланина.

Регуляторные пептиды – вещества, регулирующие многие химические реакции в клетках и тканях организма. К ним относятся пептидные гормоны, например инсулин, контролирующий содержание глюкозы в крови и клетках, вазопрессин – регулятор водного обмена и др. Интенсивно развивается учение о нейропептидах. Некоторые из них, например опиодные пептиды, по рецепторному типу взаимодействуют с различными участками головного мозга и формируют эффект анальгезии, т.е. уменьшение болевых ощущений. К нейропептидам относятся пентапептиды (энкефалины), выделенные из мозга животных, которые оказывают обезболивающее действие и используются как лекарственные средства [25]. В ГУНИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН проводятся фундаментальные исследования по разработке дипептидных лекарственных средств. Созданы оригинальные нейротропные глицин – и пролинсодержащие дипептидные соединения: ноопепт, ГБ-115, дилепт, которые сочетают нейротропные свойства с иммунокорригирующей и противовоспалительной активностями [26].

Физиологически активные пептиды осуществляют глобальную регуляцию организма. У пептидов достигается высокая информационная плотность, которая обеспечивает возможность их взаимодействия с множеством рецепторных систем и регуляции самых разнообразных функций. Пептидные препараты (по сравнению с непептидным) обладают рядом преимуществ: высокая активность, отсутствие токсичности,

отсутствие грубых побочных эффектов, возможность перорального применения за счет большей стабильности и способности проникать через биологические барьеры. В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова дипептидное направление в создании лекарственных препаратов развивается более 25 лет.

Синтезирован ряд высокоактивных дипептидных препаратов: ноотроп, ноолепт, антипсихотик дилепт, нейропротектор ГК-2 [27].

Получены синтетические дипептиды на основе глутамина и разработаны технологии их производства. Дипептиды аланин-глутамин, глицин-глутамин обладают высокой эффективностью (биодоступность 100 %) и включены в программу нутриционной терапии [28]. К компонентам фармакологического питания (нутрицевтикам) относятся аминокислоты и их производные. В онкологической практике в качестве нутриента больным парентерально вводится дипептид глутамин-аланин («дипептивен»). Он показан пациентам со сниженными запасами глутамина – при истощении, в процессе лучевой и химиотерапии и др.

При парентеральном питании особое внимание уделяется глутамину в форме дипептида, который усиливает иммунитет, восстанавливает работу органов и систем (особенно желудочно-кишечного тракта) [29].

Сходство в строении глицилглицина и аминокислоты глицина обуславливает биологические свойства дипептида. Благодаря этому он используется как составная часть некоторых лекарственных средств.

Например, созданы лекарственные препараты свертывания крови «КОАГИЛ-VII», «Новосэвен», содержащие глицилглицин, натрия хлорид, кальция хлорид дигидрат, полисорбит 80, маннитол.

Препараты используются при лечении кровотечений и их профилактики, при хирургических вмешательствах и других инвазивных процедурах [30].

Глицилглицин входит в состав фермента глицилглицин дипептидазы. Дипептидазы (экзогидролазы) составляют особую группу ферментов, осуществляющих заключительные стадии гидролиза белков. Дипептидазы ответственны за пополнение фонда свободных аминокислот для метаболических потребностей организма и имеют особое значение для нервной ткани [25]. Функция глицилглицин дипептидазы нервной ткани заключается в регуляции уровня глицина в зависимости от его метаболической потребности.

## **2.2. Синтез комплексных солей глицилглицина щелочных, щелочноземельных металлов (лития, натрия, магния, кальция) и их свойства**

Перспективным направлением в создании эффективных лекарственных средств является фармакоэлементология, разработка способов получения биогенных комплексонов аминокислот. В этом плане значительный интерес представляют дипептиды, в частности глицилглицин, который наряду с амино- и карбоксильной группами (как и у глицина) содержит пептидную группу, способную принимать участие в комплексообразовании.

Известно, что перспективными лекарственными препаратами являются соли глицина щелочных и щелочноземельных металлов (лития, натрия, магния, кальция) [16, 17].

Установлено, что соединения лития относятся к психотропным веществам, которые объединены в группу норматических средств (норматимиков). Они обладают способностью купировать острое маниакальное возбуждение у психических больных и предупреждать аффективные приступы [10].

Глицинат магния – активный хелат, который повышает абсорбцию и толерантность кишечника к магнию. Глицинат магния применяется для лечения аутизма у детей.

Магний самый важный минерал для сердца. Ионы магния активизируют ряд энзимных систем, оказывают протективное действие на клеточные мембраны, на реологические свойства крови, что способствует предупреждению атеросклероза [13].

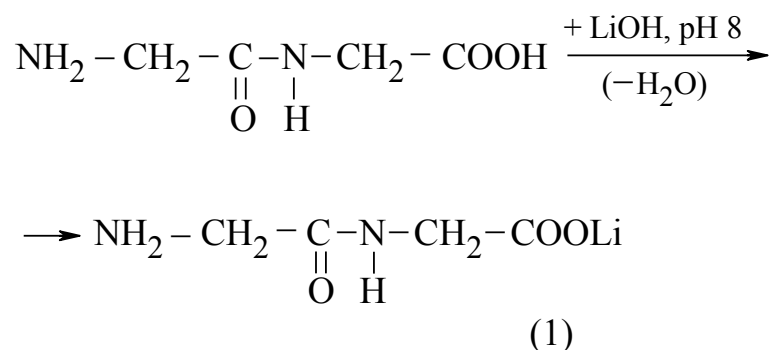
Исследована возможность применения глицината кальция в качестве препарата для направления транспортировки кальция в костную ткань, а также для восполнения дефицита кальция в условиях антиорто-статической гипокинезии [14].

Учитывая высокую биологическую активность указанных солей глицина и сходство в строении глицина и глицилглицина, обуславливающее биологические свойства дипептида, нами проведены исследования по синтезу солей щелочных и щелочноземельных металлов глицилглицина [30].

В доступной литературе отсутствуют сведения о получении солей щелочных и щелочноземельных металлов глицилглицина (лития, натрия, магния, кальция).

Глицилглицинат лития получают действием на водный раствор глицилглицина гидроксидом лития.

Схема реакции:



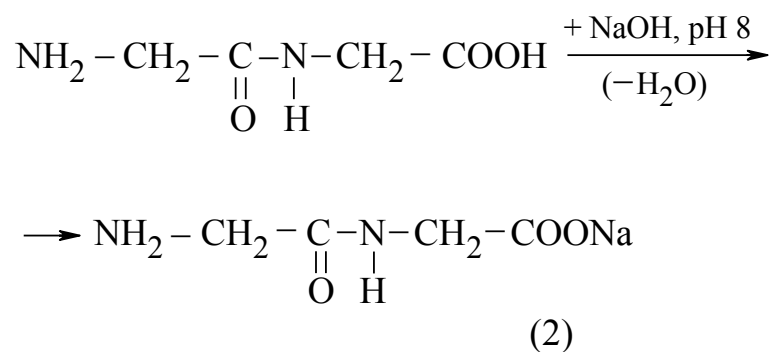
При эквимольном соотношении субстрата и реагента (1 : 1) реакция протекает в гомогенной фазе при pH 8. В мягких условиях, температура реакции 40 °С, время 20 минут, глицилглицинат лития получают с выходом 75 %. Продукт хорошо растворяется в воде и легко очищается от труднорастворимого гидроксида лития.

Для подтверждения структуры полученного соединения проведены качественные реакции на функциональные группы [31].

**Реакция на NH<sub>2</sub>-группу.** При действии на водный раствор глицилглицината лития хлоридом железа (III) образуется хелат красного цвета; с сульфатом меди (II) в слабокислой среде с добавлением ацетата натрия – хелат ярко синего цвета.

**Реакция на пептидную (– CO – NH –) группу.** При действии на водный раствор литиевой соли глицилглицина 10 %-ным раствором гидроксида натрия и 1 %-ным раствором сульфата меди (II) протекает биуретовая реакция и раствор окрашивается в ярко фиолетовый цвет.

Изучение взаимодействия глицилглицина с гидроксидом натрия показало, что в зависимости от соотношения субстрата и реагента, pH среды реакция замещения протона на катион натрия (Na<sup>+</sup>) протекает или по карбоксильной группе или одновременно по карбоксильной и пептидной группам. При эквимольном соотношении глицилглицина и гидроксида натрия (1 : 1), pH 8 первоначально идет реакция нейтрализации по карбоксильной группе по схеме:

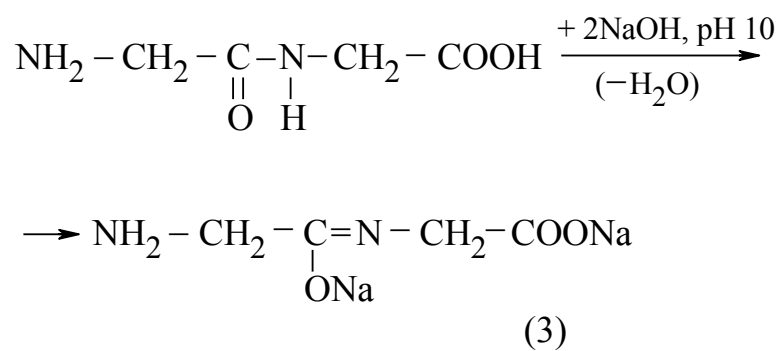




В мягких условиях реакции при температуре 50 °С в течение 20 минут при pH 8 получают глицилглицинат натрия с выходом 83,33 %. Продукт хорошо растворим в воде (pH 8), низкоплавкий – температура плавления 89–90 °С. Глицилглицинат натрия дает качественную реакцию на NH<sub>2</sub>-группу с хлоридом железа (III) (красное окрашивание) и сульфатом меди (II) с добавлением ацетата натрия (ярко синее окрашивание), а также на пептидную группу (фиолетовое окрашивание).

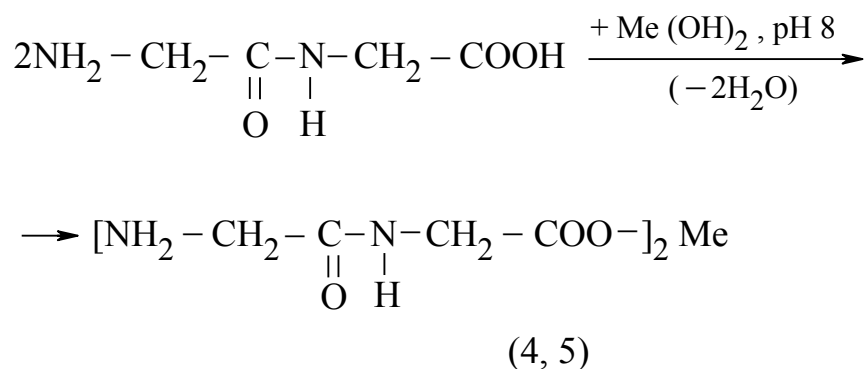
При соотношении глицилглицина и гидроксида натрия (1 : 2) в молях, pH 10 в реакцию вступают карбоксильная и пептидная группы. В сильно щелочной среде пептидная группа превращается из кетоформы в иминольную (енольную) форму, в которой и взаимодействует с ионами натрия.

Схема реакции:



В оптимальных условиях реакции: температура 55 °С, время 20 минут, pH 10, получают динатрий глицилглицинат с выходом более 80 %. Продукт хорошо растворяется в воде (pH 9), высокоплавкий, температура начала разложения 183 °С. Динатрий глицилглицинат дает качественную реакцию на NH<sub>2</sub>-группу с хлоридом железа (III) и сульфатом меди (II) в слабокислой среде. В водном растворе (pH 9) с ионами Cu<sup>2+</sup> образуется осадок Cu (OH)<sub>2</sub>.

Реакция взаимодействия глицилглицина с гидроксидами магния и кальция протекает с образованием соответствующих солей по карбоксильной группе:



где Me = Mg<sup>2+</sup> (4); Ca<sup>2+</sup> (5).

Способ получения глицилглицината магния и глицилглицината кальция основан на классической реакции нейтрализации. Показано, что выхода целевых продуктов зависят от растворимости в воде реагентов и температуры реакции. Реакция глицилглицина с гидроксидом магния протекает в водном растворе при 60 °С в гомогенной фазе, рН 8, в течение 25 минут с выходом целевого продукта 90 %. Взаимодействие глицилглицина с гидроксидом кальция идет в водной среде при температуре 95–97 °С в гетерогенной фазе, рН 8, в течение 35 минут с выходом глицилглицина кальция 80 %.

Продукты (4, 5) хорошо растворяются в воде (рН 8). Глицилглицинат магния высокоплавкий, температура начала разложения 184 °С. Начало разложения глицилглицината кальция – 136 °С.

Глицилглицинаты магния и кальция дают качественную реакцию на  $\text{NH}_2$ -группу и пептидную ( $-\text{CO} - \text{NH}$ )-группу; на ионы  $\text{Mg}^{2+}$  с гидроксидом натрия и ионы  $\text{Ca}^{2+}$  – с оксалатом аммония, соответственно.

### **Методики синтеза комплексных солей глицилглицина лития, натрия, магния, кальция**

Для синтеза солей были использованы следующие реактивы: глицилглицин (дипептид), содержание основного вещества 99,8 %, производства «ACROS Organics» (Бельгия), гидроксид лития одноводный, квалификации «хч», гидроксиды натрия, магния и кальция марки «хч».

#### **1. Синтез глицилглицината лития**

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды (рН 6) прибавляют 0,32 г (0,0076 моль) гидроксида лития,  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Наблюдается разогрев реакционной массы до 30 °С. Гомогенный раствор (рН 8) нагревают до 40 °С 15–20 минут, выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре и упаривают. Вязкую массу охлаждают, промывают этанолом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 0,98 г (74,4 %) глицилглицината лития дигидрата,  $\text{LiC}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Глицилглицинат лития дигидрат белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде (рН 8), не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 117 °С наблюдается начало разложения.

#### **2 Синтез глицилглицината натрия**

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 35 °С. Гомогенный раствор (рН 8) нагревают

до 50 °С 15–20 минут, выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Вязкую массу охлаждают, промывают этанолом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 1,2 г (83,33 %) глицилглицината натрия дигидрата,  $\text{NaC}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат натрия дигидрат белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде (рН 9), не растворяется в спирте, ацетоне. Плавится при температуре 89–90 °С.

### **3. Синтез динатрия глицилглицината**

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 0,6 г (0,0152 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 38 °С. Гомогенный раствор (рН 10) нагревают до 55 °С 20 минут, выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Вязкую массу охлаждают, промывают этанолом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 1,3 г (81,25 %) динатрия глицилглицината дигидрата,  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Динатрий глицилглицинат дигидрат белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде (рН 9), не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 183–189 °С наблюдается начало разложения.

### **4. Синтез глицилглицината магния**

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 0,175 г (0,0038 моль) гидроксида магния. Наблюдается разогрев реакционной массы до 29 °С и полное растворение гидроксида магния. Гомогенный раствор (рН 8) нагревают до 60 °С 25 минут, выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Остаток промывают спиртом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 1,1 г (90,16 %) глицилглицината магния дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Mg} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат магния дигидрат кристаллический продукт с бирюзовым оттенком, хорошо растворяется в воде (рН 8), не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 184 °С наблюдается начало разложения.

### **5. Синтез глицилглицината кальция.**

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 0,28 г (0,0038 моль) гидроксида кальция. Реакционную смесь нагревают при 95–97 °С в течение 30–35 минут и горячий раствор фильтруют. Гомогенный раствор (рН 8) фильтрата упаривают. Остаток промывают спиртом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 1,03 г (80,0 %) глицилглицината,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат кальция дигидрат кристаллический продукт белого цвета, хорошо растворяется в воде (рН 8), не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 136 °С наблюдается начало разложения.

Данные анализов комплексных солей глицилглицината щелочных и щелочноземельных металлов приведены в табл. 2.

Таким образом, изучена реакция взаимодействия глицилглицина с гидроксидами лития, натрия, магния, кальция и получены соответствующие соли. Показано, что способ их синтеза основан на классической реакции нейтрализации, отличается технологичностью и позволяет приготовить целевые продукты в количествах, необходимых для исследования их биологической активности.

Таблица 2

## Данные анализов комплексных солей глицилглицина щелочных и щелочноземельных металлов

№ соединения	Брутто формула	Название соединения (дигидратов)	Выход %	Содержание % N		Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
				Найдено	Вычислено				
1.	LiC <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат лития	74,40	15,95	16,09	Белый	117 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na –CO – NH-гр.(NaOH – CuSO <sub>4</sub> )
2.	NaC <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат натрия (енольная форма)	83,33	14,60	14,73	Белый	89-90	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na –CO – NH-гр.( – CuSO <sub>4</sub> )
3.	Na <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Динатрий глицилглицината (енольная форма)	81,25	13,08	13,20	Белый	183 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na (Na <sup>+</sup> ) – Cu <sup>2+</sup>
4.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Mg · 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат магния	90,16	8,53	8,69	Бирюзовый	184 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na –CO – NH-гр.(NaOH – CuSO <sub>4</sub> ) (Mg <sup>2+</sup> ) – NaOH
5.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Ca · 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат кальция	80,0	8,14	8,28	Белый	136 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na –CO – NH-гр.(NaOH – CuSO <sub>4</sub> ) (Ca <sup>2+</sup> ) – оксалат аммония

Сокращения: н. разл. – начало разложения; х.р. – хорошо растворяется.

### **2.3. Синтез комплексных солей глицилглицина двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства**

Известно, что комплексные соли глицина микроэлементов марганца, железа, цинка, меди [20, 21] и кобальта [5] характеризуются высокой биологической доступностью и имеют важное значение в питании животных, а также применяются в медицинской практике [3].

Глицинат марганца в хелатной форме широко известный препарат, который используют в составе витаминно-минерального комплекса. Глицинат марганца помогает укреплять стенки артерий, предотвращает развитие атеросклероза, отвечает за выработку супероксиддисмутазы – фермента, который защищает клетки нашего организма от неблагоприятного воздействия свободных радикалов. Глицинат марганца также необходим для нормального функционирования мозга, для выработки энергии, бесперебойной работы поджелудочной железы, синтеза нуклеотидов и холестерина.

Глицинат железа (II) («Эко Трейс Fe 20 %») – органическое соединение железа, служит источником железа для всех видов сельскохозяйственных животных и птиц. Кормовая добавка полностью растворим в воде. В отличие от неорганических источников железа препарат не образует в ЖКТ нерастворимых соединений [3].

Железо (II) участвует в окислительно-восстановительных процессах, является важным компонентом для образования гемоглобина. При недостатке железа происходит исхудание, задержка роста, снижение репродуктивных функций животных.

Медные и цинковые соли  $\alpha$ -аминокислот являются биологически активными веществами. Хелатные соединения меди с глицином более полезны для животных и птиц, чем сульфат меди. Глицинат и глутаминат меди, медь-иод-белковый комплекс оказывает положительное влияние на содержание и доступность меди в процессе ее всасывания и метаболизма, на содержание гемоглобина и эритроцитов. Медь необходима для многих функций, связанных со здоровьем и продуктивностью всех видов животных, включая птицу. Медь обеспечивает прочность кожи, костей и тканей кишечника.

Цинк является самым распространенным металлом клеточных ферментов, играет незаменимую роль в процессе размножения

и обновления клеток, развития иммунитета и иммунной реакции, репродукции регуляции генов.

В препаратах цинк должен быть обязательно в сочетании с органической молекулой, например с аминокислотой (цинк глицинат, цинк метионинат) в хелатной форме, как в «Трансфер Факторе Плюс». Это естественная форма, легко усваивается организмом и не создающая конкуренции другим микроэлементам при усвоении [3].

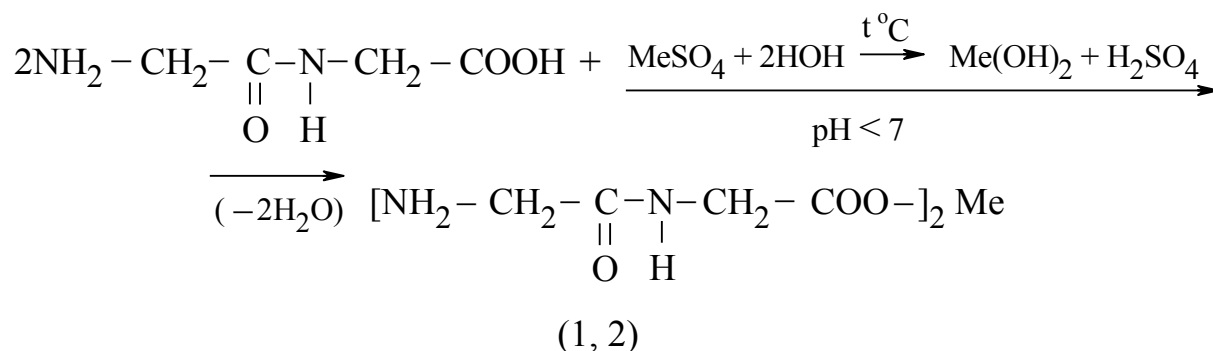
Комплексонаты  $\alpha$ -аминокислот с ионами  $\text{Co}^{2+}$  обладают широким спектром биологического действия. Кобальт относится к числу важнейших микроэлементов, входит в группу эссенциальных (жизненно необходимых) микроэлементов для животных и человека. Кобальт участвует в кроветворении, играет роль активатора ферментов в обмене веществ. Физиологический эффект кобальта обусловлен его присутствием в молекуле витамина B12 [5]. Учитывая высокую биологическую активность комплексных солей глицина двухвалентных 3d-металлов и аналогию в строении с глицилглицином, нами проведены экспериментальные исследования по изучению его комплексообразующей способности с указанными микроэлементами [32].

В доступной литературе отсутствуют сведения о методах получения комплексонатов глицилглицина 3d-металлов. Имеются работы по расчетам стандартных термодинамических характеристик комплексообразования глицилглицина с ионами меди (II), цинка (II), кобальта (II) [33].

Ранее [20] нами сообщалось о разработке способа получения комплексных солей марганца (II) и железа (II) с глицином. Сущность способа заключается в следующем: первоначально проводят гидролиз сульфатов металлов в водной среде (pH 2–3), а затем прибавляют субстрат. В процессе гидролиза образуются гидроксид марганца (II),  $\text{Mn}(\text{OH})_2$  и гидроксид железа (II),  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ , соответственно. Гидроксиды Me (II) хорошо растворимы в кислой среде и не подвергаются быстрому окислению, в щелочной среде – нерастворимы и быстро окисляются до гидроксидов металлов (III).

Глицилглицинаты марганца (II) и железа (II) получают по аналогичной методике действием на водный раствор гидролизатов сульфата Mn (II) и сульфата железа (II), соответственно, глицилглицином. Реакция протекает в гомогенной фазе в кислой среде. При температуре реакции 45–50 °C, времени 30–35 минут целевые продукты получают с выходами более 90 %.

Схема реакции:

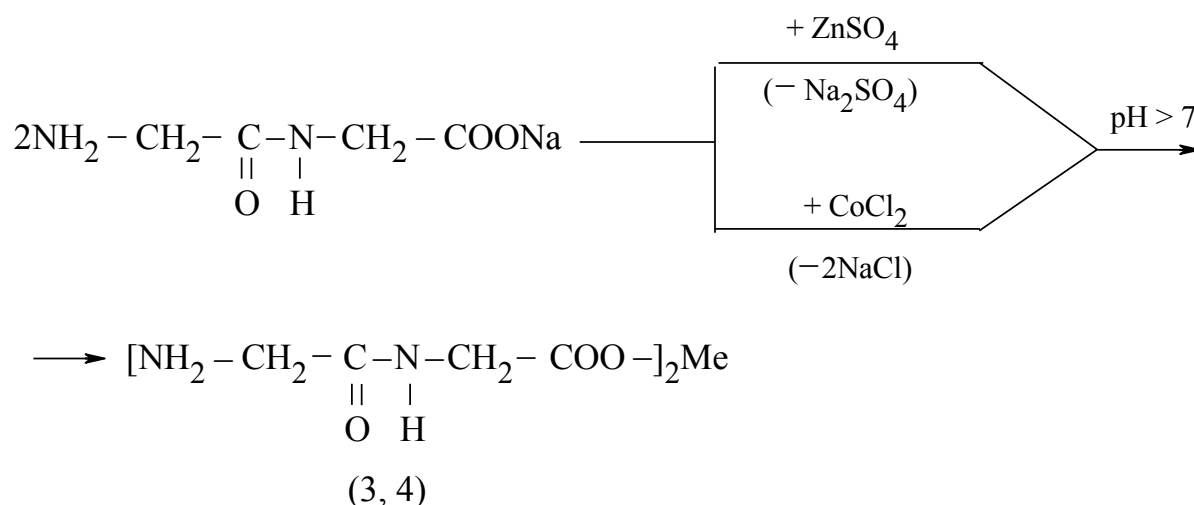


где  $\text{Me} = \text{Mn}^{2+}$  (1);  $\text{Fe}^{2+}$  (2).

Глицилглицилаты  $\text{Mn}$  (II),  $\text{Fe}$  (II) представляют собой высокоплавкие вещества хорошо растворимые в воде, нерастворимые в спирте.

Глицилглицилаты кобальта (II) и цинка получают действием на гомогенную реакционную смесь глицилглицина и гидроксида натрия в водной среде хлоридом кобальта (II) и сульфатом цинка, соответственно (присыпание кристаллических реагентов). Установлено, что применение в реакции водных растворов реагентов снижает выход и качество препаратов, так как реагенты (неорганические соли) легко гидролизуются с образованием труднорастворимых гидроксидов и легко окисляемого  $\text{Co}(\text{OH})_2$ . В оптимальных условиях, температура реакции 55–60 °С, время 20 минут, щелочная среда (pH 8), целевые продукты получают с выходами более 90 %.

Схема реакции:



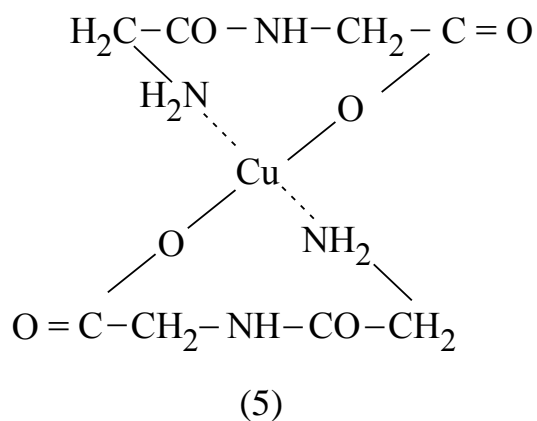
где  $\text{Me} = \text{Co}^{2+}$  (3);  $\text{Zn}^{2+}$  (4).



Из данных эксперимента следует, что комплексообразование глицилглицина с ионами металлов не идет по пептидной группе, а идет по amino-и карбоксильной группам (с ионами  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  в слабой среде, с ионами  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  в щелочной среде, pH 8,5).

Для подтверждения структуры полученных комплексных солей глицилглицина (1–4) проведены качественные реакции [31, 34]. Соли (1, 4) дают качественную реакцию на aminoгруппу с хлоридом железа (III) – хелат красного цвета, с сульфатом меди с добавлением ацетата натрия – хелат ярко синего цвета. Соль кобальта (3), имеющая темно-вишневый цвет, с сульфатом меди в водном растворе окрашивается в ярко синий цвет. В сильнощелочной среде pH > 10 на пептидную группу качественную реакцию дают соли кобальта (3) и цинка (4) (фиолетовое окрашивание). В этих условиях соль марганца (1) и соль железа (2) образуют осадок  $Mn(OH)_2$  и  $Fe(OH)_2$ , соответственно. С  $K_3[Fe(CN)_6]$  глицилглицинат железа (II) (2) образует темно-синий осадок турнбулевой сини  $Fe_3[Fe(CN)_6]_2$ , а глицилглицинат цинка (4) – темно-желтый осадок  $Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ . Комплексообразование по функциональным группам глицилглицина с ионами  $Cu^{2+}$  протекает в зависимости от условий реакции.

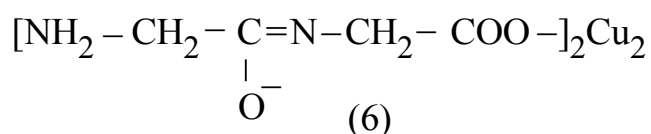
В слабокислой (pH 5–6) и слабощелочной (pH 8) средах глицилглицин с ионами  $Cu^{2+}$  образует хелатный комплекс (с выходами более 90 %) по amino-и карбоксильной группам  $[NH_2 - CH_2 - CO - NH - CH_2 - COO -]_2Cu$  (5):



При pH 8 глицилглицинат меди (II) получается с небольшой примесью биуретового комплекса (методика 5.1 (б) и продукт имеет голубой цвет с фиолетовым оттенком. Глицинат меди (II) 5.1 (а) продукт ярко голубого цвета, хорошо растворяется в воде, разлагается при 196–198 °С.

Продукты 5.1 (а, б) дают качественную реакцию на пептидную группу (фиолетовое окрашивание), на ионы  $\text{Cu}^{2+}$  – с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  выпадает осадок красно-бурого цвета  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

В сильно щелочной среде ( $\text{pH} > 10$ ) глицилглицин с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  образует двойной комплекс одновременно по трем функциональным группам: амино-, карбоксильной и пептидной, ди-(глицилглицинат) дикупрат (6) (выход более 90 %). В сильно щелочной среде пептидная группа из кетоформы превращается в иминольную (енольную) форму, которая взаимодействует с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , образуя медный биуретовый комплекс фиолетового цвета (биуретовая реакция) [32]:



Ди-(глицилглицинат) дикупрат (6) получается и при действии на хелатный комплекс (5) гидроксидом натрия и сульфатом меди (II) при  $\text{pH} > 10$  с выходом более 90 %.

Двойной комплекс – кристаллический продукт темно-фиолетового цвета, в воде растворяется с трудом, в спирте не растворяется. При температуре  $205^\circ\text{C}$  наблюдается начало разложения. В водном растворе с ионами  $\text{Cu}^{2+}$   $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образует осадок красно-бурого цвета  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

### **Методики синтеза комплексных солей глицилглицина марганца, железа, кобальта, меди, цинка**

#### **1. Синтез глицилглицината марганца (II)**

Раствор 1,83 г (0,0076 моль) сульфата марганца (II),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 18 мл воды ( $\text{pH}$  3) нагревают до  $45\text{--}50^\circ\text{C}$  в течение 20 минут. К гомогенному раствору ( $\text{pH}$  2) присыпают порциями 2 г (0,0152 моль) глицилглицина, нагревают 30–35 минут до  $45\text{--}50^\circ\text{C}$  ( $\text{pH}$  реакционного раствора 6,5), выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Вязкую массу охлаждают, промывают спиртом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 2,5 г (95,0 %) глицилглицината марганца (II) дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Mn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат марганца (II) дигидрат кристаллический продукт с розоватым оттенком, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре  $186^\circ\text{C}$  наблюдается начало разложения.

## **2. Синтез глицилглицината железа (II)**

Раствор 2,1 г (0,0076 моль) сульфата железа (II),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 20 воды (pH 3) нагревают до 50 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору (pH 2) присыпают 2 г (0,0152 моль) глицилглицина. Реакционную смесь желтого цвета нагревают 30 минут до 45 °С (pH 6,5), выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре, фильтруют и упаривают. Вязкую массу промывают спиртом, кристаллизуют и сушат. Получают 2,35 г (98,0 %) глицилглицината железа (II) дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат железа (II) дигидрат кристаллический продукт темно-коричневого цвета. Препарат хорошо растворяется в воде (водный раствор светложелтый), не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 206 °С наблюдается начало разложения.

## **3. Синтез глицилглицината кобальта (II)**

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 35 °С. Гомогенный раствор нагревают до 50–55 °С (pH 8,5) и присыпают 0,9 г (0,0038 моль) хлорида кобальта (II),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Реакционную смесь выдерживают 15 минут при 55 °С в течение трех часов при комнатной температуре (pH 5), а затем фильтруют и упаривают. Остаток промывают спиртом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают 1,29 г (97,72 %) глицилглицината кобальта (II) дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Co} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат кобальта (II) дигидрат кристаллический продукт темно-вишневого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 190 °С наблюдается начало разложения.

## **4. Синтез глицилглицината цинка**

К раствору 2 г (0,0152 моль) глицилглицина в 20 мл воды прибавляют 0,6 г (0,0152 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 36 °С. Гомогенный реакционный раствор нагревают до 55–60 °С (pH 8,5) и присыпают по частям 2,1 г (0,0076 моль) сульфата цинка,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Через 5–7 минут выпадает белый осадок. Реакционную смесь выдерживают 30 минут при 55 °С, в течение одного часа при комнатной температуре (pH 5) и охлаждают. Осадок фильтруют, промывают водой (качественный контроль на сульфаты с  $\text{BaCl}_2$ ), спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 2,6 г (94,50 %) глицилглицината цинка дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Глицилглицинат цинка дигидрат кристаллический продукт белого цвета, в воде, в спирте, ацетоне не растворяется. При температуре 198 °С наблюдается начало разложения.

## **5. Синтез медных комплексов глицилглицината**

### **5.1. Синтез хелатного комплекса глицилглицината меди (II)**

*а)* В слабокислой среде (pH 5–6).

К раствору 1 г (0,0076 моль) глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 1 г (0,0038 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 г (0,00365 моль) ацетата натрия и выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре. Гомогенный раствор (pH 5–6) ярко синего цвета упаривают, кристаллический продукт промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 1,32 г (96,60 %) хелатного комплекса глицилглицината меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Хелатный комплекс глицилглицината меди (II) дигидрат кристаллический продукт ярко голубого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 196 °С наблюдается начало разложения.

*б)* В щелочной среде (pH 8).

К раствору 2 г (0,0152 моль) глицилглицина в 15 мл воды прибавляют 0,61 г (0,0152 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 35 °С, выдерживают 10 минут и нагревают до 50 °С. К гомогенному раствору (pH 8) присыпают 1,9 г (0,0076 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и нагревают 25 минут при 55 °С. Реакционную смесь охлаждают, выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Кристаллический продукт промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 2,6 г (96,0 %) хелатного комплекса глицилглицината меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Хелатный комплекс глицилглицинат меди (II) дигидрат кристаллический продукт голубого цвета с фиолетовым оттенком. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 199 °С наблюдается начало разложения.

### **5.2. Синтез двойного комплекса глицилглицината меди (II)**

*а)* К раствору 2 г (0,0152 моль) глицилглицина в 15 мл воды прибавляют 1 г (0,025 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 38 °С, выдерживают 10 минут и нагревают до 55 °С. К гомогенному раствору (pH > 7) присыпают по частям 1,9 г (0,0076 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и нагревают 30 минут при 55–60 °С.

Реакционную смесь охлаждают, выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Кристаллический продукт промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 3,0 г (93,75 %) двойного комплекса глицилглицината меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3\text{N}_2\text{Cu}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Двойной комплекс глицилглицината меди (II) дигидрат кристаллический продукт темнофиолетового цвета, с трудом растворяется в воде при комнатной температуре, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 205 °С наблюдается начало разложения.

б) К раствору 1 г (0,0027 моль) хелатного комплекса (5.1.а) в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0075 моль) гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 32 °С, выдерживают 10 минут и нагревают до 50 °С. К гомогенному раствору ( $\text{pH} > 7$ ) присыпают 0,35 г (0,00135 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и нагревают 20 минут при 50 °С. Реакционную смесь охлаждают, выдерживают в течение одного часа при комнатной температуре и упаривают. Кристаллический продукт промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 1,1 г (94,0 %) двойного комплекса глицилглицината меди (II) дигидрата, кристаллического продукта темно-фиолетового цвета.

В результате проведенных экспериментов изучена реакция комплексообразования глицилглицина с 3*d*-биогенными металлами.

Показано, что в слабо кислой среде и слабо щелочной средах комплексообразование глицилглицина с ионами марганца, железа, кобальта, меди, цинка идет по амино- и карбоксильной группам. В сильно щелочной среде комплексообразование глицилглицина с ионами меди идет по трем функциональным группам, включая пептидную группу.

В оптимальных условиях синтезированы комплексонаты глицилглицина 3*d*-биогенных металлов с высокими выходами, что позволяет исследовать их биологическую активность.

Данные анализов комплексных солей глицилглицина двухвалентных 3*d*-металлов приведены в таб.3.

Таблица 3

## Данные анализов комплексных солей глицилглицина двухвалентных 3d-металлов металлов

№ соединения	Брутто формула	Название соединения (дигидратов)	Выход %	Содержание % N		Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
				Найдено	Вычислено				
1.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Mn· 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат марганца (III)	95,0	7,82	7,93	Белый розовый оттенок	186 (н.разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Mn <sup>2+</sup> (NaOH)
2.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Fe· 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат железа (II)	98,0	7,65	7,80	Темно-коричневый	206 (н.разл.)	х.р.	Fe <sup>2+</sup> (K <sub>3</sub> [(CN) <sub>6</sub> ], NaOH)
3.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Co· 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат кобальта (II)	97,72	7,09	7,20	Темно-вишневый	190 (н.разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na (–CO – NH-гр.) (NaOH + CuSO <sub>4</sub> )
4.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Zn· 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат цинка	94,50	7,56	7,70	Белый	198 (н.разл.)	н.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na Zn <sup>2+</sup> (K <sub>3</sub> [(CN) <sub>6</sub> ], NaOH); (–CO – NH-гр.) (NaOH + CuSO <sub>4</sub> )
5.	[C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> Cu· 2H <sub>2</sub> O	Глицилглицинат меди (II) (хелатный комплекс)	96,60	7,60	7,70	голубой	196 (н.разл.)	х.р.	–CO – NH-гр.(NaOH – CuSO <sub>4</sub> ); Cu <sup>2+</sup> (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])
6	[C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> Cu] <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Ди-(глицилглицинат) дикупрат	93,75	6,48	6,60	Темно-фиолетовый	205 (н.разл.)	тр.р.	Cu <sup>2+</sup> (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])

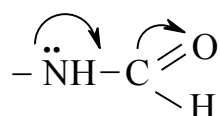
Сокращения: н. разл. – начало разложения; х. р. – хорошо растворяется; т.р. – трудно растворяется;  
н. р. – не растворяется

## 2.4. Изучение кето-енольной таутомерии пептидной связи глицилглицина при комплексообразовании с ионами металлов

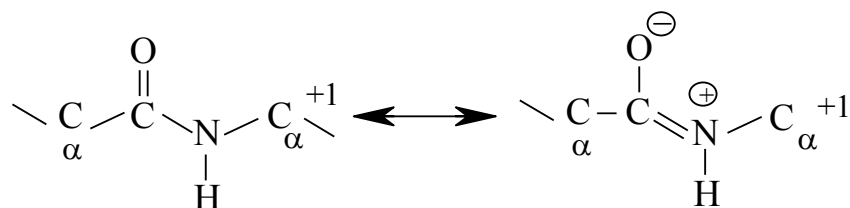
Экспериментальные исследования по изучению комплексообразующей способности дипептида глицилглицина с ионами 3d-биогенных металлов показали, что процесс комплексообразования может идти по amino-, карбоксильной и пептидной группам в зависимости от pH реакционной среды. В оптимальных условиях синтезированы комплексоны глицилглицина с высокими выходами [32].

Комплексообразование дипептидов с ионами биогенных металлов представляет интерес, так как позволяет моделировать биологические системы, в которых свойства белка модифицированы присоединением иона металла.

Пептидная (амидная) группа в пептидах является p, π-сопряженной системой, в которой неподеленная пара электронов атома азота сопряжена с электронами π-связи кетогруппы:

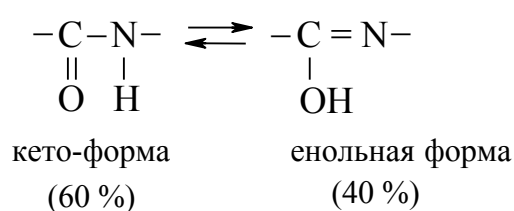


Как и в случае любых аминов, в пептидной связи за счет резонанса канонических структур связь C – N между углеродом карбонильной группы и атомом азота NH-группы имеет частично характер двойной (сопряженной) связи.

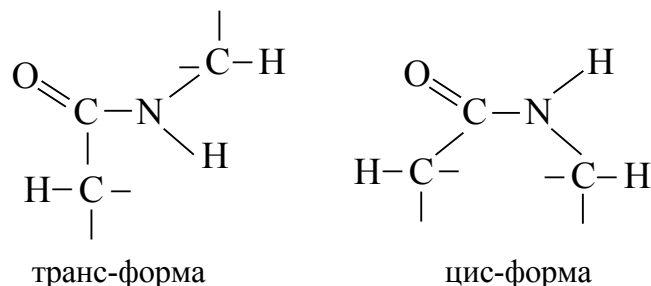


Это проявляется в уменьшении ее длины до 0,132 нм по сравнению с длиной одинарной простой связью C – N – 0,147 нм.

В пептидах и белках пептидная группа находится в состоянии кето-енольной таутомерии:



Частично сопряженный характер  $-\text{C}-\text{N}-$  связи обуславливает плоскую конфигурацию  $-\text{CO}-\text{NH}-$  группы (все четыре атома копланарны, т. е. находятся в одной плоскости) и существование транс-и цис-форм:



Транс-изомеры более устойчивы.

Пептидные связи очень прочны и самопроизвольно не разрываются при нормальных условиях. При нагревании с концентрированными кислотами или щелочами происходит гидролиз пептидных связей с образованием свободных аминокислот.

В сильно щелочной среде пептидные группы пептидов переходят из кетоформы в енольную (иминольную) форму. В избытке щелочи происходит диссоциация водорода енольной  $\text{O}-\text{H}$ -группы. При этом возникает отрицательный заряд на атоме кислорода и при взаимодействии с катионами металлов образуются соли по енольной группе [35, 36].

С целью разработки физиологически активных дипептидных препаратов и учитывая свойства пептидной связи в кислой и щелочной средах, нами проведено изучение кето-енольной таутомерии пептидной связи глицилглицина при комплексообразовании с ионами металлов [36]. Реакция основана на взаимодействии субстрата с гидроксидами двухвалентных  $3d$ -металлов.

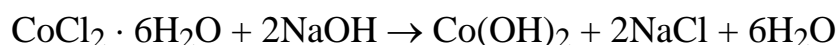
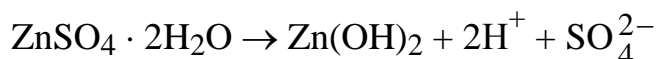
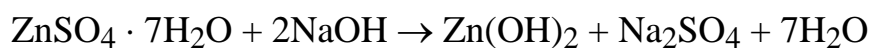
Показано, что при действии на гомогенный водный раствор гидролизатов сульфатов  $\text{Me (II)}$  ( $\text{pH } 2$ ), содержащих гидроксиды  $\text{Mn (II)}$ ,  $\text{Fe (II)}$  глицилглицином комплексообразование идет по амино- и карбоксильной группам и не идет по пептидной группе. По аналогичной схеме протекает реакция с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  при  $\text{pH} < 7$  с образованием хелатного комплекса [32, 36].

Комплексообразование глицилглицина с ионами  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  проводится действием на реакционный раствор субстрата и гидроксида натрия солями соответствующих металлов. В этом случае процесс протекает в две стадии. На первой стадии идет взаимодействие глицилглицина с гидроксидом натрия (при эквимолекулярном соотношении,  $\text{pH } 8,5$ ) с образованием мононатриевой соли по карбоксильной группе и превращение



пептидной группы из кетоформы в енольную форму. На второй стадии при прибавлении в щелочной раствор реакционной смеси солей металлов происходит образование гидроксидов Me (II) и их взаимодействие с енольной формой моносодиевой соли глицилглицина.

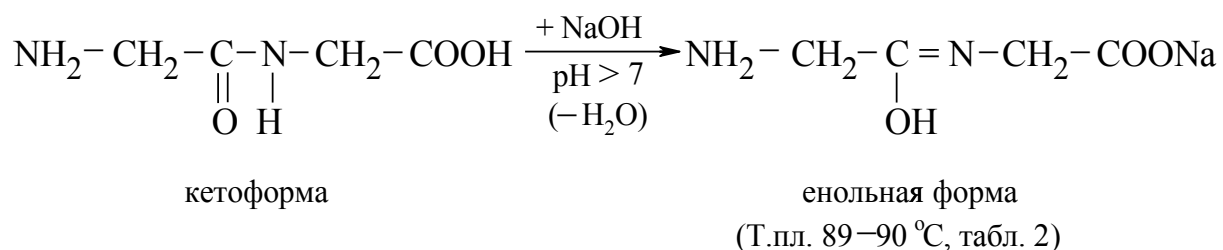
На второй стадии в реакционной смеси в водном растворе протекают следующие превращения реагентов, соответственно:



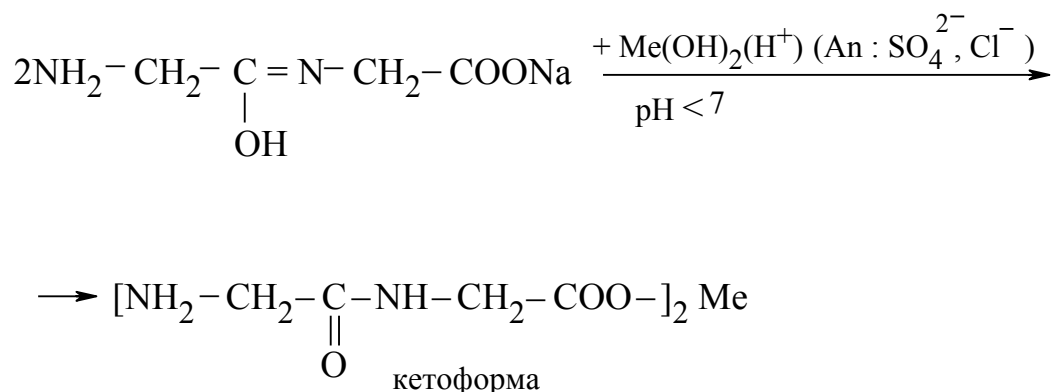
В результате указанных превращений реакционная среда становится слабокислой (pH 5).

При переходе pH среды в кислую область (от 8,5 до 5) комплексонаты глицилглицина цинка и кобальта (II) получаются в кетонной форме т.е. протекает кето-енольная таутомерия глицилглицина в две стадии по схеме:

1-стадия



2-стадия



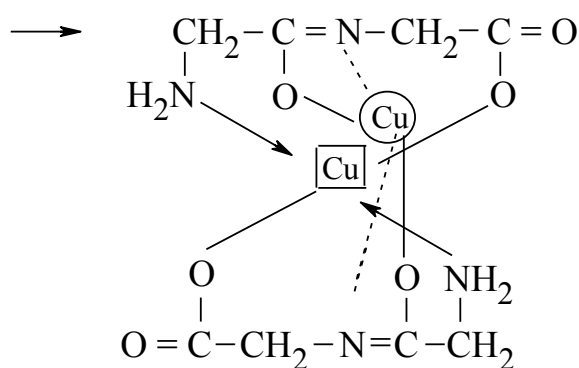
где  $\text{Me}^{2+} = \text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}$  [32] (табл. 3)

Глицилглицинат меди (II), полученный указанным способом (при pH 8,5), содержит примеси биуретового медного комплекса. В сильно щелочной среде (pH 11–12) комплексообразование глицилглицина с ионами меди (II) протекает через енольную форму динатриевой соли глицилглицина (продукт не дает качественную реакцию на пептидную группу [30]) по карбоксильной и аминной группам и по иминольной группе. В этом случае образуется двойной медный комплекс – хелатный и биуретовый, ди-(глицилглицинат)-дикупрат [36].

Схема превращения:



Тразл. 183–189 °C (табл.2)



Т.н. разл. 205 °C (табл. 3)

ди-(глицилглицинат)-дикупрат

Двойной комплекс – кристаллический высокоплавкий продукт (температура начала разложения 205 °C). В водном растворе (в воде растворяется с трудом) ионы  $\text{Cu}^{2+}$  с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образуют осадок красно-бурого цвета  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (качественная реакция).

Биуретовая реакция – метод качественного и количественного определения белков и продуктов их частичного гидролиза (пептидов) в биологических жидкостях (крови, моче), экстрактах тканей, клеток и др., заключающаяся в обнаружении и коллометрии фиолетового или красного окрашивания, появляющегося при наличии белка в результате добавления к исследуемой пробе сульфата меди. Название происходит от биурета ( $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$ ), открытого в 1847 г. Г. Видеманом при нагревании мочевины до 150–170 °С. При взаимодействии биурета в щелочных растворах с ионами меди (II) наблюдается характерное фиолетовое окрашивание, обусловленное образованием хелатного комплекса (биуретовая реакция). Остаток биурета в хелатном комплексе имеет имидную структуру.

Биуретовая реакция на пептидную связь (Пиотровского) обусловлена наличием в белке, пептидах пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с  $\text{CuSO}_4$  комплексы фиолетового цвета с красным или синим оттенком. Группа, образующая пептидную связь, в щелочной среде присутствует в своей таутомерной енольной форме.

При избытке щелочи происходит диссоциация енольной ОН-группы, появляется отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с катионом  $\text{Cu}^{2+}$ , возникает солеобразная связь. Кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи, путем использования их электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен [36].

### **Общие методики синтеза глицилглицинатов цинка, кобальта (II), меди (II)**

Синтез глицилглицината цинка.

#### ***1-Стадия – щелочная среда***

К раствору 0,0152 моль глицилглицина в 15 мл воды прибавляют 0,0152 моль гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 36 °С, выдерживают 10 минут (pH 8,5) и нагревают до 50 °С.

#### ***2-Стадия – кислая среда***

К гомогенному реакционному раствору прибавляют по частям 0,0076 моль сульфата цинка и перемешивают. Через 10 минут выпадает белый осадок. Реакционную смесь (pH 5) выдерживают 30 минут при 50 °С, в течение одного часа при комнатной температуре. Осадок фильтруют,

промывают водой (контроль на сульфаты с  $\text{BaCl}_2$ ), спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают глицилглицинат цинка дигидрат (кристаллический продукт белого цвета) с выходом 94,5 %. Продукт не растворяется в воде, спирте, ацетоне (табл. 3).

Синтез глицилглицината кобальта (II).

### ***1-Стадия – щелочная среда***

К раствору 0,0076 моль глицилглицина в 10 мл воды прибавляют 0,0076 моль гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 36 °С, выдерживают 10 минут (pH 8,5) и нагревают до 50 °С.

### ***2-Стадия – кислая среда***

К гомогенному раствору прибавляют 0,0038 моль хлорида кобальта (II) и перемешивают. Реакционную смесь выдерживают 15 минут при 55 °С (pH 5) и в течение двух часов при комнатной температуре, а затем фильтруют, фильтрат упаривают. Остаток промывают спиртом, кристаллизуют и сушат при комнатной температуре. Получают глицилглицинат кобальта (II) дигидрат (кристаллический продукт темно-вишневого цвета) с выходом 97,72 %. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. [табл. 3].

Синтез глицилглицината меди (II).

### ***1-Стадия – щелочная среда***

К раствору 0,0152 моль глицилглицина в 15 мл воды прибавляют 0,0152 моль гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 36 °С, выдерживают 10 минут (pH 8,5) и нагревают до 50 °С.

### ***2-Стадия – кислая среда***

К гомогенному раствору прибавляют 0,0076 моль сульфата меди (II) и перемешивают. Реакционную смесь нагревают 25 минут при 55 °С (pH 5), выдерживают 2 часа при комнатной температуре и упаривают. Кристаллический остаток голубого цвета промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают глицилглицинат меди (II) дигидрат (кристаллический продукт голубого цвета с фиолетовым оттенком) с выходом 96,0 %. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне.

Комплексообразование глицилглицина с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в щелочной среде (pH 11–12).

### ***Синтез двойного комплекса глицилглицината меди (II)***

К раствору 0,0152 моль глицилглицина в 15 мл воды прибавляют 0,034 моль гидроксида натрия. Наблюдается разогрев реакционной массы до 40 °С, выдерживают 10 минут (pH 11–12) и нагревают до 50 °С. К гомогенному раствору присыпают по частям 0,0152 моль сульфата меди

(II) и перемешивают. Реакционную смесь (pH 10) нагревают 30 минут при 55 °С, охлаждают, выдерживают 2 часа при комнатной температуре и упаривают. Получают двойной комплекс глицилглицината меди (II) – ди-(глицилглицинат)-дикупрат (кристаллический продукт темно-фиолетового цвета с выходом 93,75 %.). Продукт с трудом растворяется в воде при комнатной температуре, не растворяется в спирте, ацетоне (табл. 3).

Изучена кето-енольная таутомерия пептидной связи глицилглицина при комплексообразовании с ионами металлов в зависимости от pH реакционной среды. Показано, что в кислой среде не идет превращение амидной группы в иминольную (енольную). В щелочной среде (pH 8,5) (при эквимольном соотношении субстрата и гидроксида натрия) глицилглицин из кетоформы превращается в енольную форму моноватриевого производного по карбоксильной группе. При последующем действии на реакционную смесь солями металлов (pH 5) енольная форма переходит в кетонную с образованием глицилглицинатов металлов в кетоформе. В щелочной среде (pH 11–12, соотношение субстрата и гидроксида натрия 1 : 2 в молях) глицилглицин из кетоформы превращается в енольную форму динатриевого производного по карбоксильной и енольной группам. При последующем действии на динатриевое производное сульфатом меди (II) получается двойной медный комплекс в енольной форме.

## ГЛАВА 3. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ 4-ГИДРОКСИПРОЛИНА

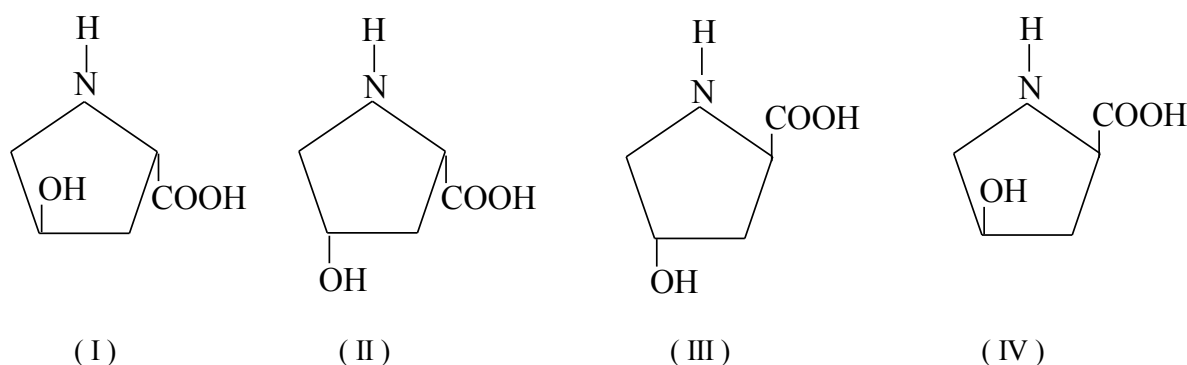
### 3.1. Физико-химические и биологические свойства 4-гидроксипролина

4-Гидроксипролин (2*S*, 4*R*)-4-гидрокси-4-гидрокси-2-карбоновая кислота, сокращенные обозначения: Нур, 4- Нур, НурPro (–JUPAC).

Брутто формула – C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>.

M<sub>m</sub> = 131,13, белые кристаллы.

Имеет два центра хиральности (положение 2 и 4). Возможно существование четырех оптически активных стереоизомеров: *L*-оксипролин (I), алло-*L*-оксипролин (II), *D*-оксипролин (III), алло-*D*-оксипролин (IV).



*L*-оксипролин (I) белые кристаллы, температура плавления 274 °C; удельное вращение в водном растворе (2,5 г в 100 мл воды) –  $[\alpha]^{25} -76,5^\circ$ . Растворимость (г /100 г воды) – 36,11 (25 °C)

Константы кислотной диссоциации:  $pK_1$  1,92(COOH),  $pK_2$  9,74(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

Изоэлектрическая точка – pI 5.83

С нингидрином дает желтое (оранжевое) окрашивание. Эта реакция используется для количественного анализа фотоколориметрическим методом. Остатки *L*-оксипролина (транс-4гидрокси-*L*-пролина) входят преимущественно в состав белков соединительной ткани – коллагена (до 13 %), а также эластина. Алло-*L*-оксипролин (II) встречается в свободном состоянии в цветах сандалового дерева. Его остатки входят в состав токсичных пептидов бледной поганки-фаллоидина, α и β-аманитинов, впервые выделенные Т. Виландоном (1940).

Алло-*D*-оксипролин (IV) выделен из антибиотика этамицина Дж. Шиханом (1958). *D*-оксипролин (III) из природных объектов не выделен.

*L*-оксипролин (I) впервые выделен из желатина Э. Фишером (1902). Получают *L*-оксипролин из гидролизатов коллагена и некоторых других белков.

*L*-оксипролин (4-гидроксипролин) заменимая неcodируемая гетероциклическая  $\alpha$ -аминокислота, не включается в пептидную цепь при биосинтезе, а образуется при ферментативном гидроксилировании остатков пролина.

Продукты метаболизма 4-гидроксипролина в организме – пиррол-2-карбоновая и глутаминовая кислоты.

В пептидном синтезе для защиты гидроксигруппы остатка 4-гидроксипролина применяют бензильную и трет-бутильную группы.

Химические реакции по атому азота пространственно затруднены.

4-Гидроксипролин является основным компонентом коллагена, который находится во внеклеточном матриксе соединительной ткани и поддерживает целостность тканей, механическую прочность связок и эластичность кожи.

Молекула коллагена представляет собой фрагмент трехмерной спирали, виток которой (триада) содержит три аминокислотных остатка – глицина, пролина, гидроксипролина.

Гидроксипролин, представленный в коллагене большим числом остатков, стабилизирует тройную спираль коллагена по отношению к действию протеаз. Гидроксипролин это не только «строительный блок» коллагена, но и важное биологически активное соединение, необходимое для образования коллагена и эластина [37, 38].

4-Гидроксипролин – биологически активное вещество, используется в синтезе лекарственных средств, например оксипрола (*N*-ацетил-4-гидрокси-*L*-пролина), который представляет интерес как нестероидное противовоспалительное средство [39].

Известно применение *L*-пролина, 4-гидроксипролина и солей на их основе в качестве терапевтических средств жаропонижающего и противовоспалительного действия [40]. 4-Гидроксипролин может использоваться в синтезе противогрибковых препаратов и хиральных лигандов.

4-Гидроксипролин представляет особый интерес для косметической промышленности, так как он обладает омолаживающим эффектом на клеточном уровне [41].

### **3.2. Синтез комплексных солей 4-гидроксипролина щелочных и щелочноземельных металлов (лития, натрия, магния, кальция) и их свойства**

Известно, что органически связанные макро-, микроэлементы с  $\alpha$ -аминокислотами (хелаты) имеют высокую биологическую доступность, значительно легче усваиваются организмом, чем неорганические соединения.

Например, аминокислотный хелат магния, в состав которого входит глицин (15 %), магний (5 %), вода (до 100 %) используется в качестве источника макроэлемента магния для птиц и всех видов животных с целью повышения их продуктивности.

Магний важный внутриклеточный катион, участвует в регуляции клеточной проницаемости и нервно-мышечной передачи.

Создан препарат Chela-Mg B<sub>6</sub> Forte. Препарат награжден Золотой Медалью ALBiON. Содержит самую легкую усваиваемую форму магния: аминокислотный хелат-бис-глицинат магния и обогащен витамином B<sub>6</sub>, который совместно с магнием принимает участие в метаболических процессах. Препарат оказывает успокоительное действие, повышает адаптационные способности организма. Эта первая пищевая добавка в мире, содержащая хорошо усваиваемую жидкую форму магния в форме аминокислотного хелата ALBiON<sup>(R)</sup>.

Магний – элемент жизни и энергии. Этот минерал поддерживает функцию сердца и всей сердечно-сосудистой системы. Однако главная функция магния заключается в участие его в синтезе и транспортировке энергии в организме (АТФ).

Препараты магния  $\alpha$ -аминокислот применяют в кардиологии, например, панангин, который содержит аспарагинаты калия и магния.

Магниевые и кальциевые соли глутаминовой кислоты в медицине используют при лечении многих психических и нервных расстройств и заболеваний.

Натриевую соль глутаминовой кислоты применяют в пищевой промышленности для улучшения ценности и вкусовых качеств продуктов [3].

Аминокислотный хелат кальция непосредственно усваивается слизистой оболочкой кишечника. При этом решается вопрос полного усвоения кальция, предотвращается образование в организме камней, осуществляется восполнение аминокислот. Употребление аминокислотного хелата кальция позволяет создать в организме «хранилище костного кальция», которое в соответствии с потребностями организма,



непрерывно выделяет ионы кальция.

Кальций – минеральное вещество, которое участвует во всем жизненном процессе человеческого организма, начиная от формирования скелета. Без кальция существование клеток было бы невозможно.

Разработаны лекарственные препараты «САВАО», «Биокальций Тяньши», содержащие аминокислотный хелат кальция. Препарат «Биокальций Тяньши» рекомендован для профилактики остеопороза, болей в суставах, детского рахита и др.

Биотехнологической компанией ООО «Байтай» разработана технология аминокислотного хелата кальция (нанокальций) на основе *L*-аспарагиновой кислоты и кальция. Коэффициент его усвоения в 3 раза выше, чем у других кальциевых препаратов. Продукт хорошо растворяется в воде и безопасен в применении [41, 42].

Перспективными лекарственными средствами являются соли лития аминокислот. Они обладают способностью купировать острое маниакальное возбуждение у психических больных и предупреждать аффективные приступы [10]. Предложено фармацевтическое средство, содержащее глицинат и аспарагинат лития, которое используется для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний [11].

На основе солей лития получена иммуностимулирующая и антиоксидантная композиция, содержащая аскорбат и аспарагинат лития в соотношении (50 : 50) [43].

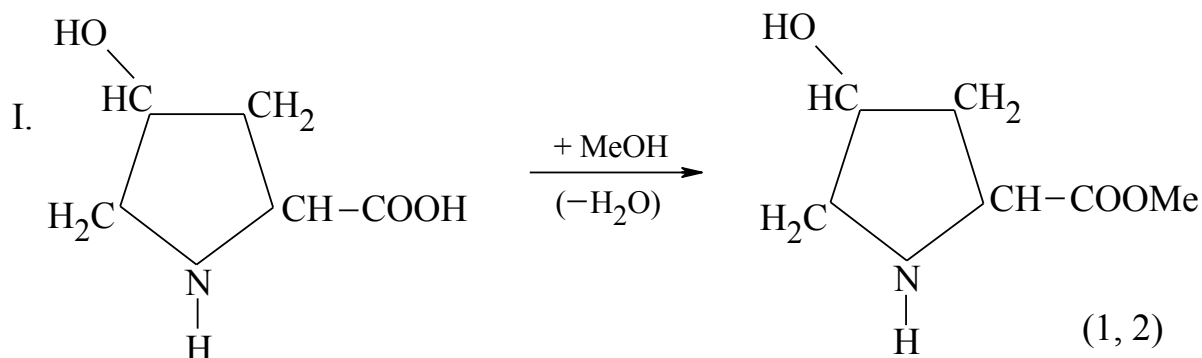
Из анализа литературных сведений следует, что комплексные соли аминокислот щелочных и щелочноземельных металлов являются соединениями широкого спектра биологического действия.

В этом плане значительный интерес представляют соли лития, натрия, магния, кальция 4-гидроксипролина – «строительного блока» коллагена.

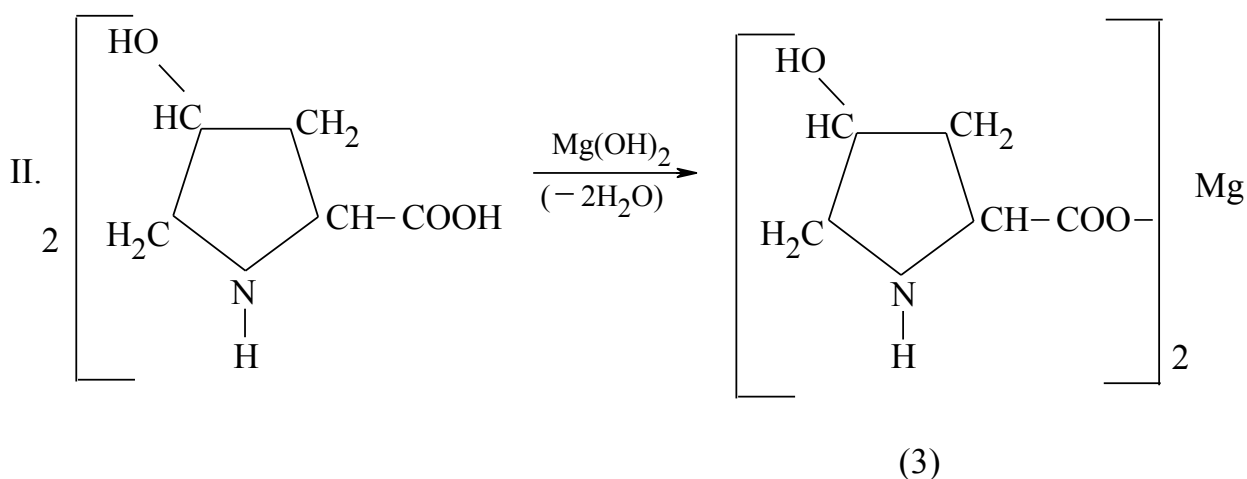
В доступной литературе отсутствуют данные о методах их синтеза и физико-химических характеристиках.

С целью изучения токсикологических и фармакологических свойств солей 4-гидроксипролина нами проведены экспериментальные исследования по разработке способов их получения и изучению физико-химических свойств.

Соли лития, натрия, магния получают взаимодействием 4-гидроксипролина с гидроксидами соответствующих металлов. Реакции протекают по схемам (I и II):



где Me = Li (1); Na (2)



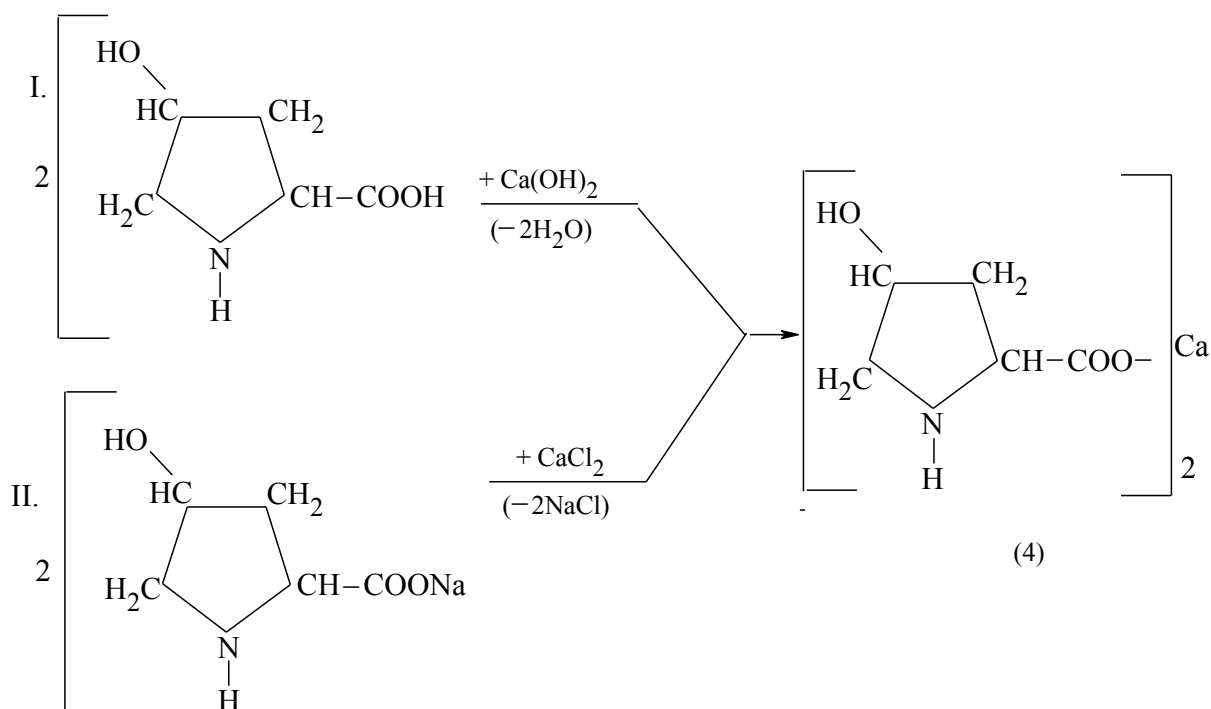
Способ получения солей (1–3) основан на классической реакции нейтрализации. В результате хорошей растворимости 4-гидроксипролина в воде (36 г / 100 г воды) и высокой степени ионизации его в щелочной среде (pH 9–10) реакции протекают в гомогенной фазе. Целевые продукты получают с высокими выходами (более 90 %).

Ранее [3] нами был разработан способ получения комплексных солей  $\alpha$ -аминокислот *d*-биогенных металлов действием на реакционную смесь аминокислоты и гидроксида натрия в водной среде (pH 9–10) сульфатом соответствующего металла без выделения промежуточной Na-соли. Реакция протекает в гомогенной фазе с высокими выходами целевых продуктов.

Для подтверждения схемы реакции по данному способу через Na-соль субстрата нами исследована реакция взаимодействия Na-соли 4-гидроксипролина с сульфатом меди (II). При действии на раствор Na-соли 4-гидроксипролина в водной среде (pH 8) сульфатом меди (II)

(в соотношении 2 : 1 в молях) наблюдается выпадение небольшого осадка  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . В этих условиях гомогенность процесса нарушается, так как гидроксид меди (II) растворяется в водной среде при pH 9–10 в результате образования куприта  $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{OH})_4]$ . Выход комплексоната меди (II) 4-гидроксипролина в данном случае составляет 66,0 %. Без выделения Na-соли субстрата выход комплексоната меди (II) 4-гидроксипролина составляет 96,87 % (табл.5).

Синтез комплексоната кальция 4-гидроксипролина осуществлялся по двум вариантам: взаимодействием субстрата с гидроксидом кальция и действием на Na – соль гидроксипролина (без выделения ее из реакционной смеси) хлоридом кальция по схемам I, II [41]:



Сущность способа получения комплексоната кальция 4-гидроксипролина по варианту (4а) – схема (I) заключается в том, что на гомогенный водный раствор 4-гидроксипролина (растворимость 36 г / 100 мл воды) действуют гидроксидом кальция при температуре 90 °С в течение 35–40 минут. Реакция протекает в гетерогенной фазе. 4-гидроксипролин относится к нейтральным  $\alpha$ -аминокислотам (изоэлектрическая точка  $pI$  5,83). Гидроксид кальция трудно растворимое основание ( $PP = 5,5 \cdot 10^{-6}$ ) и вступает в реакцию не полностью. Горячий реакционный раствор фильтруют от осадка гидроксида кальция. Гомогенный раствор упаривают с последующей обработкой сырца спиртом и выделением целевого продукта (выход 88,2 %).

С целью проведения реакции в гомогенной фазе комплексонат кальция 4-гидроксипролина получают по второму варианту (4 б), схема (II), действием на Na-соль субстрата (без выделения ее из реакционной смеси) водным раствором хлорида кальция. Однако в условиях щелочной среды (pH 9) из реакционного раствора наблюдается выпадение небольшого количества гидроксида кальция. Обработку реакционного раствора и выделение целевого продукта проводят по аналогии с методикой варианта (4 а) (выход 86,5 %).

Для подтверждения структуры полученных солей (1–4) проведены качественные реакции. Соединения (1–4) дают качественные реакции на аминогруппу: с хлоридом железа (III) образуют хелаты красного цвета, с сульфатом меди (II) с добавлением ацетата натрия – хелаты ярко-синего цвета, нингидрином растворы окрашиваются первоначально в желтый цвет, который через 30 минут переходит в фиолетовый. Комплексонат кальция 4-гидроксипролина дает качественную реакцию на ионы кальция с оксалатом аммония с образованием оксалата кальция. Комплексонат кальция 4-гидроксипролина, полученный по варианту (4 б) содержит незначительные примеси ионов хлора (качественная реакция с  $\text{AgNO}_3$ ).

### **Методики синтеза комплексных солей 4-гидроксипролина лития, натрия, магния, кальция**

Для синтеза солей были использованы следующие реактивы: trans-4-Hydroxy-L-proline, содержание основного вещества 99,0 %, New Jersey, USA: 1-800-ACROS-01; гидроксиды лития, натрия, магния, кальция, хлорид кальция марки «хч».

#### **1. Синтез литиевой соли 4-гидроксипролина**

К раствору 1 г (0,0076 моль) 4-гидроксипролина в 10 мл воды (pH 5) прибавляют 0,32 г (0,0076 моль) гидроксида лития,  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  при перемешивании до полного растворения. Гомогенную реакционную смесь нагревают при 45–50 °С в течение 35 минут (pH 9) и выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Гомогенный раствор упаривают, остаток кристаллизуют, обрабатывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 1,09 г (92,37 %) моногидрата литиевой соли 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]\text{Li} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Литиевая соль – белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. Водный раствор имеет pH 8. При температуре 220 °С обугливается.

## **2. Синтез натриевой соли 4-гидроксипролина**

К раствору 1 г (0,0076 моль) 4-гидроксипролина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия, NaOH и перемешивают до полного растворения. Гомогенную реакционную смесь нагревают при 45–50 °С 35–40 минут (pH 10) и выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Гомогенный раствор упаривают, остаток кристаллизуют, промывают этанолом несколько раз и сушат. Получают 1,33 г (92, 36 %) дигидрата натриевой соли 4-гидроксипролина,  $[C_5H_8O_3N]Na \cdot 2H_2O$ .

Натриевая соль 4-гидроксипролина – белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. Водный раствор имеет pH 8, при температуре 74–76 °С плавится, при 145–150 °С – обугливается.

## **3. Синтез магниевой соли 4-гидроксипролина**

К раствору 1 г (0,0076 моль) 4-гидроксипролина в 10 мл воды прибавляют 0,22 г (0,0038 моль) гидроксида магния,  $Mg(OH)_2$  и перемешивают до полного растворения (10 минут). Гомогенную реакционную смесь (pH 8) нагревают при 50–55 °С в течение 35–40 минут (pH 9), выдерживают при комнатной температуре 2 часа и упаривают. Кристаллический остаток промывают несколько раз этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 1,15 г (94,0 %) дигидрата магниевой соли 4-гидроксипролина,  $[C_5H_8O_3N]_2Mg \cdot 2H_2O$ .

Магниевая соль 4-гидроксипролина – блестящие белые кристаллы, хорошо растворяются в воде (водный раствор имеет pH 8), не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 174–176 °С плавится, при 195–198 °С – обугливается.

## **4. Синтез кальциевой соли 4-гидроксипролина**

а) К раствору 2 г (0,0152 моль) 4-гидроксипролина в 15 мл воды (pH 5) прибавляют по частям 0,56 г (0,0076 моль) гидроксида кальция при температуре 80–85 °С. Реакционную смесь нагревают при 90 °С в течение 35–40 минут (pH 8). Горячий раствор фильтруют от незначительного количества гидроксида кальция, не вступившего в реакцию. Гомогенный раствор фильтрата упаривают, кристаллический белый продукт промывают спиртом и сушат. Получают 2,3 г (88,2 %) кальциевой соли 4-гидроксипролина,  $[C_5H_8O_3N]_2Ca$ .

Кальциевая соль 4-гидроксипролина – белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте и ацетоне. При температуре 158 °С – начало плавления, при 170 °С – обугливание.

б) К раствору 2 г (0,0152 моль) 4-гидроксипролина в 15 мл воды прибавляют 0,6 г (0,0152 моль) гидроксида натрия (pH 9), перемешивают 10 минут и нагревают до 50 °С. К гомогенному раствору прибавляют раствор 0,8 г (0,0076 моль) хлорида кальция в 5 мл воды, нагревают до 85 °С, выдерживают 35–40 минут (pH 8) и выпавший небольшой осадок гидроксида кальция фильтруют. Гомогенный раствор фильтрата упаривают, кристаллический белый продукт промывают спиртом и сушат. Получают 2,2 г (86,5 %) кальциевой соли 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Ca}$ . Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 157 °С начало плавления, при 170 °С – обугливание.

***Взаимодействие натриевой соли 4-гидроксипролина с сульфатом меди (II)***

К раствору 0,5 г (0,0033 моль) натриевой соли 4-гидроксипролина в 10 мл воды (pH 8) прибавляют 0,41 г (0,00165 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Реакционную смесь темно-синего цвета нагревают при 50–55 °С в течение 35–40 минут. При этом наблюдается выпадение небольшого количества осадка голубого цвета,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Фильтрат упаривают, кристаллический остаток темно-синего цвета промывают спиртом и сушат. Получают 0,44 г (66,0 %) пентагидрата комплексоната меди (II) 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 168–170 °С обугливается.

Данные анализов комплексных солей 4-гидроксипролина щелочных и щелочноземельных металлов приведены в табл.4.

В результате экспериментальных исследований изучена реакция взаимодействия 4-гидроксипролина с гидроксидами щелочных и щелочноземельных металлов. Синтезированы новые соединения: соли лития, натрия, магния, кальция. В оптимальных условиях (pH реакции 9–10, гомогенность реакционной смеси) целевые продукты получают с высокими выходами. Изучены их физико-химические свойства. Способ получения солей отличается технологичностью, что позволяет приготовить их в количествах, необходимых для изучения токсикологических и фармакологических свойств.

Таблица 4

## Данные анализов комплексных солей 4-гидроксипролина щелочных и щелочноземельных металлов.

№ соединения	Брутто формула	Название соединения	Выход %	Содержание % N		Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
				Найден о	Вычислено				
1.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N]Li · H <sub>2</sub> O	Литиевая соль 4-гидроксипролина (моногидрат)	92,37	8,85	9,00	Белый	220 (обугл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na); нингидрин – желтое окрашивание
2.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N]Na · 2H <sub>2</sub> O	Натриевая соль 4-гидроксипролина (дигидрат)	92,36	7,29	7,40	Белый	74–76	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na); нингидрин – желтое окрашивание
3.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N] <sub>2</sub> Mg · 2H <sub>2</sub> O	Магниева соль 4-гидроксипролина (дигидрат)	94,0	8,60	8,75	Белый	174–176	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na); нингидрин – желтое окрашивание
4.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N] <sub>2</sub> Ca	Кальциевая соль 4-гидроксипролина	88,20	9,18	9,27	Белый	158 (н.пл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац. Na); нингидрин – желтое окрашивание; Ca <sup>2+</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )

Сокращения: обугл. – обугливание; н.пл. – начало плавления; х. р. – хорошо растворяется.

### **3.3. Синтез комплексных солей 4-гидроксипролина двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства**

Комплексные соли  $\alpha$ -аминокислот микроэлементов: марганца, железа, кобальта, меди, цинка характеризуются высокой биологической доступностью и имеют важное значение в питании животных, а также применяются в качестве лекарственных средств в медицине [3, 5].

$\alpha$ -Аминокислоты образуют с ионами двухвалентных металлов комплексы. Один ион металла образует с лигандами связи двух типов – ионную по карбоксильной группе, донорно-акцепторную по аминогруппе, давая хелатные комплексы. Хелатная форма комплексов легко усваивается организмом.

Ионы металлов, находясь в оболочке аминокислоты, не требуют дополнительных превращений в организме. Они являются готовыми к использованию и транспортировки клетками эпителия тонкой кишки, где происходит основной процесс усвоения.

Процесс усвоения микроэлементов (железо, цинк, и др.) происходит в тонком кишечнике путем активного транспорта: свободный ион металла присоединяется к транспортному белку, позволяющему переносить данный ион в кровоток (процесс органической хелации). Процесс хелирования является важнейшим фактором успешной доставки минералов в организм, а витаминно-минеральные препараты, содержащие такие формы микроэлементов, наиболее эффективные.

Известно, что для поддержания здоровья продуктивных животных значительное место занимает сбалансированное минеральное питание. Установлено, что хелатные соединения биогенных элементов с органическими лигандами проявляют различные виды биологической активности и полностью усваиваются организмом по сравнению с неорганическими соединениями (уровень биодоступности последних не более 10–20 %). Особый интерес представляют хелатные соединения металлов (марганца, железа, меди, цинка) с аминокислотами.

Органические микроэлементы – неотъемлемый компонент современного кормления животных. Полный пакет питательных компонентов должен включать минералы, которые удовлетворяют потребность животных для нормального развития скелета и являются достаточными для обеспечения потенциала роста костных тканей у современных бройлеров.



Потребность в микроэлементах – цинк, медь, марганец являются критическими для многочисленных физиологических процессов в организме всех видов животных.

**Цинк** является самым распространенным металлом клеточных ферментов. Он играет незаменимую роль в процессе размножения и обновления клеток, развития иммунитета и иммунной реакции, репродукции регуляции генов, репликации ДНК и защите против окислительного стресса и повреждений. Хелатная форма цинка с аминокислотами усваивается гораздо эффективнее по сравнению с оксидом или сульфатом цинка. Преимущества хелатной формы цинка: высокая биодоступность и усвояемость, эффективное действие при болезнях, поддержание необходимого уровня микроэлемента цинка в организме.

**Медь** как и цинк, необходима для многих функций, связанных со здоровьем и продуктивностью всех видов животных, включая птицу. Медь обеспечивает прочность кожи, костей и тканей кишечника.

**Марганец** необходим для роста и плодовитости животных. Он также играет ключевую роль в формировании костей на протяжении всего развития организма. Марганец необходим для функционирования ферментов, участвующих в формировании костной и соединительной ткани. Марганец необходим для людей с анемией (при недостатке железа).

Органические формы микроэлементов (хелаты) – залог здоровья свиноматок и поросят.

Микроэлементы входят в состав всех клеток и тканей организма, гормонов и ферментов. Они обеспечивают функционирование сердечно-сосудистой, нервной, опорно-двигательной и других систем организма; принимают участие в синтезе важнейших соединений, строении тканей, обменных процессах, кроветворении, пищеварении, нейтрализации токсичных продуктов обмена.

Некоторые из них влияют на рост животных (марганец, цинк, иод), репродукцию (марганец, цинк), кроветворение (железо, медь, кобальт).

Микроэлементы обеспечивают работу сотни энзимов в организме свиней и поддерживают иммунную систему. Они обеспечивают целостность скелета животных. Цинк и медь, например, участвуют в синтезе коллагена, который укрепляет кости и ткани (особенно соединительные). При дефиците этих микроэлементов развивается хромота.

Органические формы микроэлементов (хелаты), в отличие от неорганических соединений, имеют лучшую биологическую доступность.

Они легче устанавливают ионную связь с клетками организма, распадаются и полностью усваиваются.

Все хелатные соединения имеют гетероциклическую структуру, которая обеспечивает стабильность и защиту во время пищеварения, а следовательно, оптимальное всасывание микроэлементов. Это основное отличие органических и неорганических форм микроэлементов.

Разработан хелат «Хеламикс» с аминокислотами глицином и метионином, содержащий микроэлементы (Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Cr, Se, J) для свиней и птицы. «Хеламикс» обладает антистрессовым и иммуностимулирующим эффектом, нормализует обмен веществ. Результаты применения – повышение продуктивности животных и качества продукции. Уникальность продукта – микроэлементы находятся в биологически доступной хелатной форме, их усвояемость очень высокая.

Получено средство для суставов «Flexagen Olimp», включающий натуральный коллаген II типа и гидролизат коллагена с дополнением в виде витаминов C, B<sub>6</sub> и минералов (кальция, фосфора, магния, марганца и меди). В составе «Flexagen» марганец и медь присутствуют в виде аминокислотных хелатов: марганца диглицината – 15 %, меди диглицината – 15 % (компании «Albion»), которые хорошо усваиваются организмом.

Марганец и медь – натуральные антиоксиданты, защищающие ткани организма от воздействия свободных радикалов.

Из анализа литературных данных следует, что аминокислотные хелаты микроэлементов в настоящее время являются единственным видом продукции, соответствующей требованиям биологически активных препаратов для восполнения микроэлементов в организме [44].

В этом плане перспективными биологически активными веществами являются комплексоны 4-гидроксипролина, «строительного блока» коллагена, биогенных двухвалентных 3d-металлов.

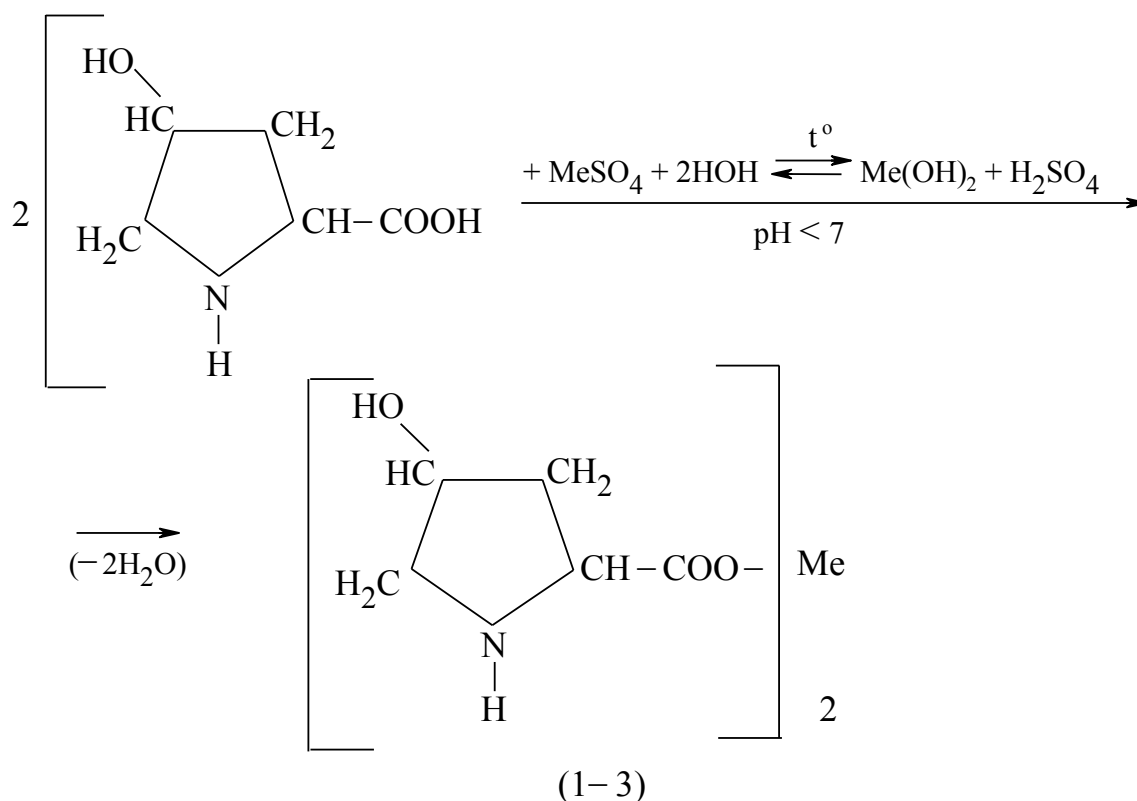
В доступной литературе отсутствуют сведения о методах их синтеза и физико-химических свойствах.

Для изучения токсикологических и фармакологических свойств комплексонов 4-гидроксипролина с биогенными металлами нами проведено экспериментальное исследование реакции комплексообразования и исследование по разработке доступных способов получения комплексных соединений: марганца, железа, кобальта, меди, цинка [41, 44].

Ранее нами был разработан способ получения комплексонов марганца и железа с глицином и метионином [20] действием на реакционный водный раствор гидролизатов соответствующих сульфатов металлов  $\alpha$ -аминокислотами в кислой среде (pH 3). В процессе

гидролиза сульфатов  $\text{Me}(\text{II})$  образуются гидроксид марганца (II) и гидроксид железа (II), которые хорошо растворяются в кислой среде и не подвергаются окислению до гидроксидов  $\text{Me}(\text{III})$ . Оптимальные данные [20] были использованы в синтезе комплексонатов марганца (II), железа (II), кобальта (II) по схеме (I):

Схема реакции (I):



где  $\text{Me} = \text{Mn}^{2+}$  (1);  $\text{Fe}^{2+}$  (2a);  $\text{Co}^{2+}$  (3).

Из данных эксперимента следует, что протекание реакции и выход целевых продуктов зависит от следующих факторов: гомогенности реакционного раствора, рН среды, растворимости субстрата в воде, растворимости реагентов в кислой или щелочной средах и их устойчивости к окислению.

В оптимальных условиях реакции (кислая среда pH 3, гомогенность реакционного раствора) комплексоны (марганца, железа, кобальта) 4-гидроксипролина получают с выходами более 90 %.

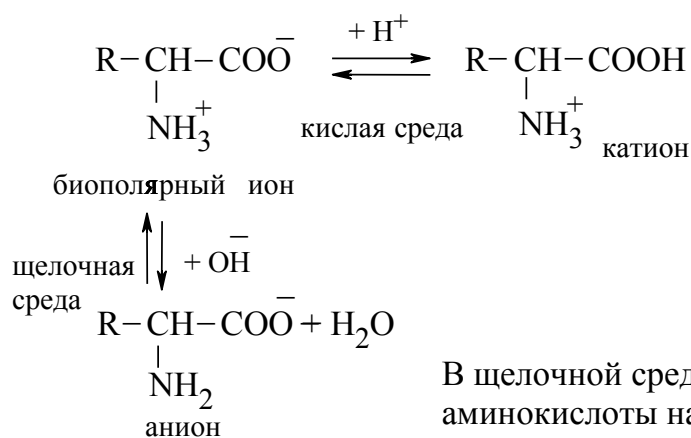
Комплексообразование 4-гидроксипролина с гидроксидом Mn (II) в щелочной среде (вариант 1 б) протекает аномально, так как  $Mn(OH)_2$  (основной гидроксид) растворяется только в кислой среде (кислотах) и в данных условиях (рН 9) легко окисляется с образованием темно-бурого нерастворимого осадка  $MnO(OH)_2$  и выделить целевые продукты не удастся.

Комплексообразование 4-гидроксипролина с гидроксидом железа (II) в щелочной среде (pH 9) протекает в гетерогенной фазе, так как  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  не растворяется в щелочных растворах и легко окисляется до  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Выход целевого продукта составляет 52,2 % (вариант 2 б).

Реакция комплексообразования 4-гидроксипролина с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  однозначно протекает в щелочной гомогенной среде (pH 9). Гидроксид меди,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  в щелочной среде и при нагревании растворяется в результате образования куприта  $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{OH})_4]$ . Гидроксид цинка,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  проявляет амфотерность, легко растворяется в щелочах за счет образования растворимых гидроксоцинкатов  $\text{Na}_2[\text{Zn}(\text{OH})_4]$ .

Известно, что  $\alpha$ -аминокислоты обладают амфотерными свойствами и существуют в растворах в виде биполярных ионов.

На ионизацию аминокислот в водных растворах большое влияние оказывают значения pH-среды. В кислой среде высокая концентрация протонов подавляет диссоциацию карбоксильных групп и аминокислоты заряжаются положительно, переходя в форму катионов:



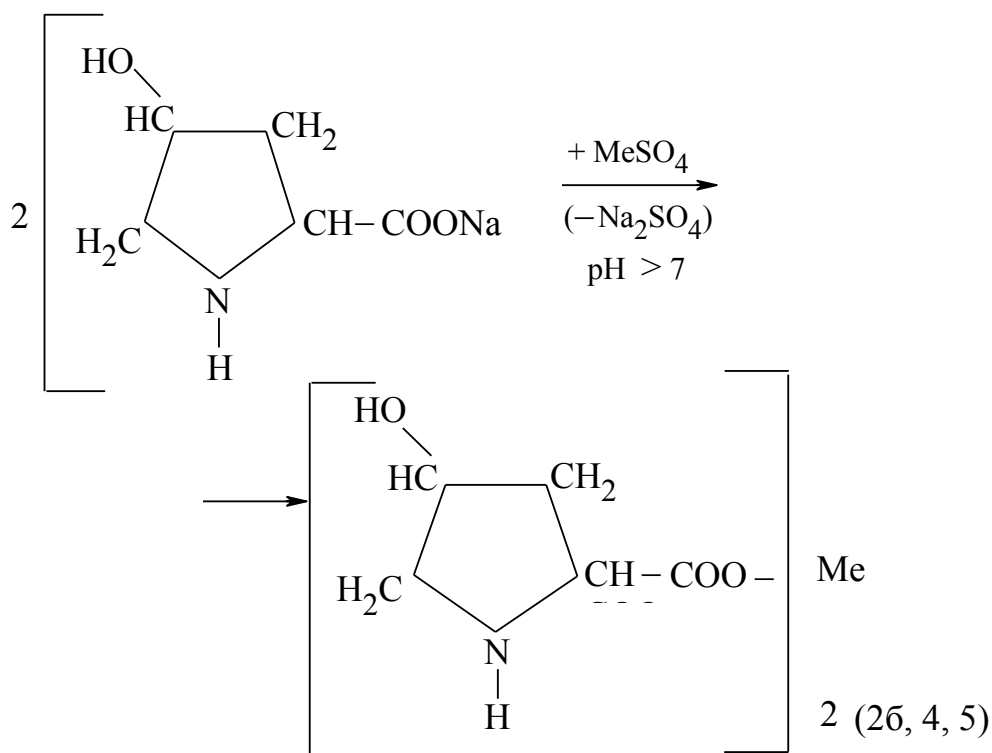
В щелочной среде при избытке анионов  $\text{OH}^-$  аминокислоты находятся в виде анионов, так как

диссоциируют протонированные аминогруппы. Таким образом, величина заряда аминокислоты находится в тесной взаимосвязи с значением pH реакционной среды [38].

В щелочной среде (pH 9) при избытке  $\text{OH}^-$ -анионов 4-гидроксипролин находится в виде аниона и скорость комплексообразования с катионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  значительно выше, чем скорость образования малорастворимых гидроксидов, что и обуславливает гомогенность реакционной среды.

Комплексонаты меди (II), цинка и железа (II) (1б) получают по схеме (II):

Схема реакции (II):



где  $\text{Me} = \text{Fe}^{2+}$  (26);  $\text{Cu}^{2+}$  (4);  $\text{Zn}^{2+}$  (5).

Сущность способа получения комплексонатов по схеме (II) заключается в действии сульфата соответствующего металла (присыпание кристаллического реагента) на реакционную смесь 4-гидроксипролина и гидроксида натрия в воде (pH 9). В мягких условиях, температура реакции 50–55 °С, время 30–35 минут, гомогенная фаза комплексонаты меди (II) (4) и цинка (5) 4-гидроксипролина получают с выходами 96,87 % и 95,65 %, соответственно.

Для подтверждения структуры полученных комплексонатов 4-гидроксипролина проведены качественные реакции. Соединения (1–5) дают качественную реакцию на аминогруппу: с хлоридом железа (III) образуют хелаты красного цвета; с сульфатом меди (II) с добавлением ацетата натрия – хелаты ярко синего цвета (соединения 1–3,5).

Раствор комплексоната марганца (II) 4-гидроксипролина с нингидрином окрашивается в ярко желтый цвет; при действии гидроксидом натрия выпадает бледно-розовый осадок  $\text{Mn}(\text{OH})_2$ , который постепенно буреет, превращаясь в  $\text{MnO}((\text{OH})_2)$ .

Раствор комплексоната железа (II) 4-гидроксипролина (2 а, б) с нингидрином окрашивается в фиолетовый цвет; при действии гидроксида натрия выпадает осадок  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  грязно зеленого цвета; с  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

наблюдается выпадение темно-синего осадка турнбулевой сини,  $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ .

Раствор комплексоната кобальта (II) 4-гидроксипролина (3) с нингидрином окрашивается в желтый цвет; при действии гидроксидом натрия выпадает осадок  $\text{Co}(\text{OH})_2$  синего цвета. Раствор комплексоната меди (II) 4-гидроксипролина (4) с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образует осадок  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  красно-бурого цвета.

Раствор комплексоната цинка 4-гидроксипролина (5) с  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образует осадок  $\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$  желто-коричневого цвета; с нингидрином окрашивается в фиолетовый цвет.

### **Методики синтеза комплексных солей 4-гидроксипролина марганца, железа, кобальта, меди, цинка**

#### **1. Синтез комплексоната марганца (II) 4-гидроксипролина**

а) Раствор 1,84 г (0,0076 моль) сульфата марганца (II),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды нагревают при 45–50 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (рН 3) присыпают по частям 2 г (0,0152 моль) гидроксипролина, выдерживают 30–35 минут при 45–50 °С и 2 часа при комнатной температуре. Гомогенный реакционный раствор упаривают, кристаллический остаток промывают несколько раз спиртом (качественный контроль на сульфаты с  $\text{BaCl}_2$ ) и сушат. Получают 2,6 г (96,3 %) комплексоната дигидрата марганца (II) 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Mn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Дигидрат марганца 4-гидроксипролина кристаллический продукт белого цвета с розоватым оттенком, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При 176 °С наблюдается начало разложения.

б) К раствору 1 г (0,0076 моль) гидроксипролина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия, перемешивают 10 минут (рН 9, нагревают до 50–55 °С. К гомогенному раствору присыпают по частям 0,9 г (0,0038 моль) сульфата марганца (II),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  при перемешивании и нагревают при 50 °С в течение 30–35 минут. При этом наблюдается выпадение темно-бурого осадка, который фильтруют и гомогенный светлорозовый раствор упаривают из чашки Петри при комнатной температуре. При стоянии в течение одного часа из раствора выпадает темно-бурый осадок  $\text{MnO}(\text{OH})_2$ , а при упаривании раствора образуется полимерная стекловидная масса.

## **2. Синтез комплексоната железа (II) 4-гидроксипролина**

а) Раствор 1,06 г (0,0038 моль) сульфата железа (II),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды нагревают при 45–50 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (рН 3) присыпают 1 г (0,0076 моль) гидроксипролина, выдерживают 30–35 минут при 45–50 °С и 2 часа при комнатной температуре. Гомогенный реакционный раствор имеет светло-желтый цвет. Раствор упаривают при комнатной температуре, кристаллический остаток промывают несколько раз спиртом (качественный контроль на сульфаты с  $\text{BaCl}_2$ ) и сушат. Получают 1,3 г (96,3 %) комплексоната дигидрата железа (II) 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Дигидрат железа (II) 4-гидроксипролина кристаллический продукт темно-серого цвета с зеленоватым оттенком. Продукт растворяется в воде, но из раствора при стоянии выпадает темный порошок вследствие гидролиза соли. В спирте препарат не растворяется. При температуре 138–142 °С наблюдается обугливание соли.

б) К раствору 1 г (0,0076 моль) 4-гидроксипролина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия, перемешивают 10 минут и нагревают до 50–55 °С (рН 9). К гомогенному раствору прибавляют 1,06 г (0,0038 моль) сульфата железа (II),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  при перемешивании и нагревают при 45–50 °С в течение 30–35 минут. При этом наблюдается выпадение осадка грязно зеленого цвета  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ . Гетерогенную смесь перемешивают в течение двух часов при 45–50 °С, охлаждают, осадок фильтруют и фильтрат упаривают при комнатной температуре. Кристаллический остаток темного цвета промывают спиртом и сушат. Получают 0,7 г (52,0 %) комплексоната дигидрата железа (II) 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . При температуре 142–143 °С наблюдается обугливание препарата.

## **3. Синтез комплексоната кобальта (II) 4-гидроксипролина**

Раствор 1,07 г (0,0038 моль) сульфата кобальта (II),  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды нагревают при 45–50 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (красноватого цвета) (рН 9) прибавляют 1 г (0,0076 моль) гидроксипролина, выдерживают 30–35 минут при 45–50 °С и 1,5 часа при комнатной температуре. Затем гомогенный реакционный раствор бледно-розового цвета упаривают при комнатной температуре, кристаллический остаток промывают несколько раз спиртом (качественный контроль на сульфаты с  $\text{BaCl}_2$ ) и сушат. Получают 1,58 г (97,46 %) комплексоната гексагидрата кобальта (II) 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Комплексонат кобальта (II) кристаллический продукт розового цвета с бежевым оттенком. Препарат хорошо растворяется в воде.

(водный раствор розового цвета), не растворяется в спирте. При температуре 128–130 °С продукт обугливается.

#### **4. Синтез комплексоната меди (II) 4-гидроксипролина**

К раствору 1 г (0,0076 моль) 4-гидроксипролина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия, перемешивают 10 минут и нагревают до 50–55 °С. К гомогенному раствору (pH 9) прибавляют 0,95 г (0,0038 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  при перемешивании и нагревают при 50 °С в течение 30–35 минут. Гомогенный реакционный раствор (ярко темно-синего цвета) выдерживают в течение двух часов при комнатной температуре и упаривают. Кристаллический остаток промывают несколько раз спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 1,55 г (96,87 %) комплексоната пентагидрата меди (II) 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Комплексонат меди (II) кристаллический продукт темно-синего цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 165–170 °С продукт обугливается.

#### **5. Синтез комплексоната цинка 4-гидроксипролина**

К раствору 1 г (0,0076 моль) 4-гидроксипролина в 10 мл воды прибавляют 0,3 г (0,0076 моль) гидроксида натрия, перемешивают 10 минут и нагревают до 50 °С. К гомогенному раствору (pH 9) прибавляют 1,1 г (0,0038 моль) сульфата цинка,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  при перемешивании и нагревают при 50 °С в течение 30–35 минут. Гомогенный светлый реакционный раствор выдерживают при комнатной температуре два часа и упаривают. Кристаллический остаток белого цвета промывают спиртом и сушат при комнатной температуре. Получают 1,32 г (95,65 %) дигидрата цинка 4-гидроксипролина,  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Комплексонат цинка кристаллический продукт белого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 198–201 °С продукт обугливается.

Данные анализов комплексных солей 4-гидроксипролина двухвалентных 3d-металлов приведены в табл. 5.

На основе экспериментальных данных изучена реакция комплексообразования 4-гидроксипролина с ионами марганца (II), железа (II), кобальта (II), меди (II) и цинка. Определены факторы, влияющие на процесс комплексообразования, основными из которых являются pH-среды и гомогенность реакционной смеси. В оптимальных условиях получены новые комплексные соединения 4-гидроксипролина с биогенными двухвалентными 3d-металлами с высокими выходами, что позволяет изучить их токсикологические и фармакологические свойства.



Таблица 5

## Данные анализов комплексных солей 4-гидроксипролина двухвалентных 3d-металлов

№ соединения	Брутто формула	Название соединения	Выход %	Содержание % N		Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
				Найдено	Вычислено				
1	2	3	4	5	6	6	8	9	10
1.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N] <sub>2</sub> Mn · 2H <sub>2</sub> O	Комплексонат марганца (II) 4-гидроксипролина (дигидрат)	96,3	7,78	8,00	Розовый	176 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – желтое окрашивание; Mn <sup>2+</sup> (NaOH)
2.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N] <sub>2</sub> Fe · 2H <sub>2</sub> O	Комплексонат железа (II) 4-гидроксипролина (дигидрат)	96,3	7,80	7,93	Темно-серый с зеленым оттенком	138–142 (обугл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – фиолетовое окрашивание Fe <sup>2+</sup> (NaOH; K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])
3.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N] <sub>2</sub> Co · 6H <sub>2</sub> O	Комплексонат кобальта (II) 4-гидроксипролина (гексагидрат)	97,46	6,45	6,57	Розово-бежевый	128–130 (обугл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – желтое окрашивание; Co <sup>2+</sup> (NaOH)
4.	[C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> N] <sub>2</sub> Cu · 5H <sub>2</sub> O	Комплексонат меди (II) 4-гидроксипролина (пентагидрат)	96,87	6,74	6,63	Ярко-синий	165–170 (обугл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> ) Cu <sup>2+</sup> (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])

Окончание табл. 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	$[\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Комплексонат меди (II) 4-гидроксипролина (дигидрат)	95,65	7,65	7,73	Белый	198–201 (обугл.)	х.р.	$\text{NH}_2$ -гр.( $\text{FeCl}_3$ , $\text{CuSO}_4 + \text{Ац. Na}$ ); нингидрин – фиолетовое окрашивание $\text{Zn}^{2+}$ ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )

Сокращения: обугл. – обугливание; н.разл. – начало разложения; х. р. – хорошо растворяется.

## ГЛАВА 4. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

### 4.1. Физико-химические и биологические свойства $\gamma$ -аминомасляной кислоты

$\gamma$ -Аминомасляная кислота, ИЮПАК – 4-аминобутановая кислота. Сокращенные обозначения: ГАМК, GABA. Брутто формула –  $C_4H_9O_2N$ .  $M_m = 103, 120$ ; белые кристаллы, слабый горький вкус, специфический запах. Плотность: 1,11 г / мл. Температура плавления 203 °С, температура кипения 247,9 °С. Растворимость в воде – 130 г / 100 мл; 5 %-водный раствор имеет рН 6,5–7,5. Константы кислотной диссоциации:  $pK_1$  4,03 ( $COOH$ );  $pK_2$  10,56 ( $NH_3^+$ ). Изoeлектрическая точка –  $pI$  7,29.  $LD_{50}$  12680 мг /кг (мыши, перорально). Слаботоксичное вещество – раздражитель (для стандартных условий – 25 °С, 100 кПа) [25, 38, 45].

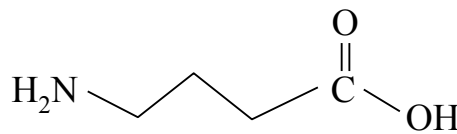
ГАМК является гибкой цвиттер-ионной молекулой, т.е. с депротонированной карбоксигруппой и протонированной, аминогруппой  $[H_3N^+ - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO^-]$ , которая может существовать в различных конформациях.

В газовой фазе высокая конформация более предпочтительна из-за электростатического притяжения между двумя функциональными группами. Стабилизация составляет около 50 ккал / моль, согласно квантовым химическим расчетам. В твердом состоянии конформация более расширена, с транс-конформацией на амино-конце и гош (скошенная) – конформацией на карбоксильном конце. Это связано с взаимодействиями с соседними молекулами. В растворе пять различных конформаций (некоторые из которых сложенные и некоторые – расширенные) присутствуют благодаря эффектам сольватации. Конформационная гибкость ГАМК имеет важное значение для ее биологической функции, так как было установлено, что ГАМК связывается с различными рецепторами различными конформациями.

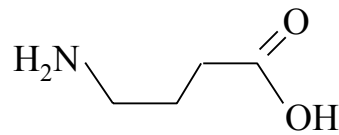
Методами квантовохимических расчетов, рентгеноструктурного анализа, изучением биодействия синтетических аналогов с жестко фиксированным строением и ряда природных агонистов и антагонистов ГАМК было надежно установлено, что наиболее предпочтительной для тормозящего эффекта является вытянутая конформация ГАМК.

Расстояние между заряженными атомами  $N^+$  и  $O^-$  составляет в этом случае 5,4 Ангстрем. Для свернутой конформации ГАМК оно находится в пределах 4,2–4,7 Ангстрем.

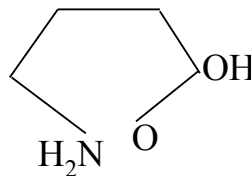
В организме человека ГАМК существует в нескольких конформационных модификациях: линейной, ковшеобразной и циклической.



линейная конформация



конформация ковша



циклическая конформация

Каждая из этих форм ГАМК отличается по своей биологической роли в организме.

Линейная конформация ГАМК – определяет ее эффекты тормозного медиатора, модулирует противосудорожный эффект.

Циклическая конформация ГАМК – регулирует метаболические процессы в головном мозге, модулирует поведенческие реакции организма.

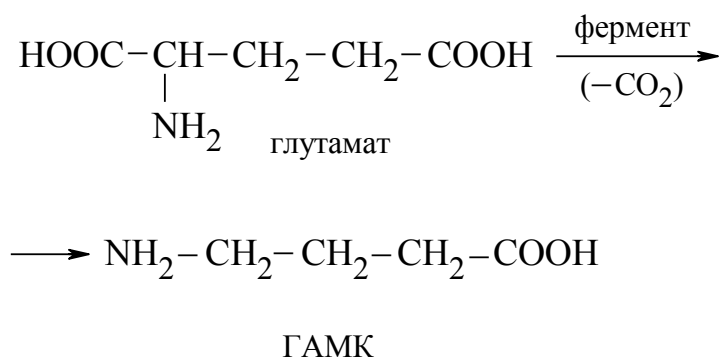
Ковшеобразная конформация ГАМК – определяет роль ГАМК как участника фоторецепции [45].

Различное действие каждой из конформаций объясняется влиянием ГАМК на различные подтипы рецепторов. В настоящее время выделяют 3 типа ГАМК-рецепторов: ГАМК<sub>А</sub>, ГАМК<sub>В</sub>, ГАМК<sub>С</sub>.

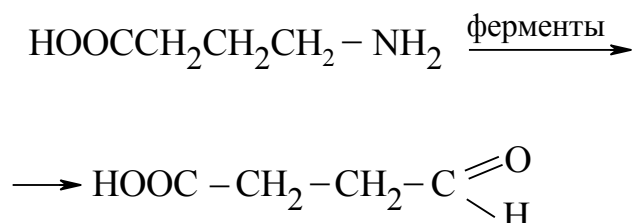
ГАМК – заменимая аминокислота, находящаяся в основном в человеческом мозге и глазах. Она рассматривается, как ингибирующий нейромедиатор, регулирующий деятельность мозга и нервных клеток, путем снижения числа сгорающих в мозге нейронов.

ГАМК является в ЦНС основным ингибитором-нейротрансмиттером. Кроме того, ее действие проявляется и в истощении катехоламинергической системы. ГАМК можно назвать «натуральным успокаивающим мозг агентом». Препятствуя перевозбуждению мозга, ГАМК способствует расслаблению и снижению нервного перенапряжения.

В организме ГАМК образуется только в нервной системе из глутаминовой кислоты, концентрация которой в мозговой ткани составляет 10 мкМ/г в результате декарбоксилирования при помощи фермента глутаматдекарбоксилазы:



Цикл превращений в мозге включает сопряженные ферментативные реакции как декарбоксилирование, так и переаминирование ГАМК ГАМК-трансаминазой в глутамат с образованием янтарного полуальдегида:



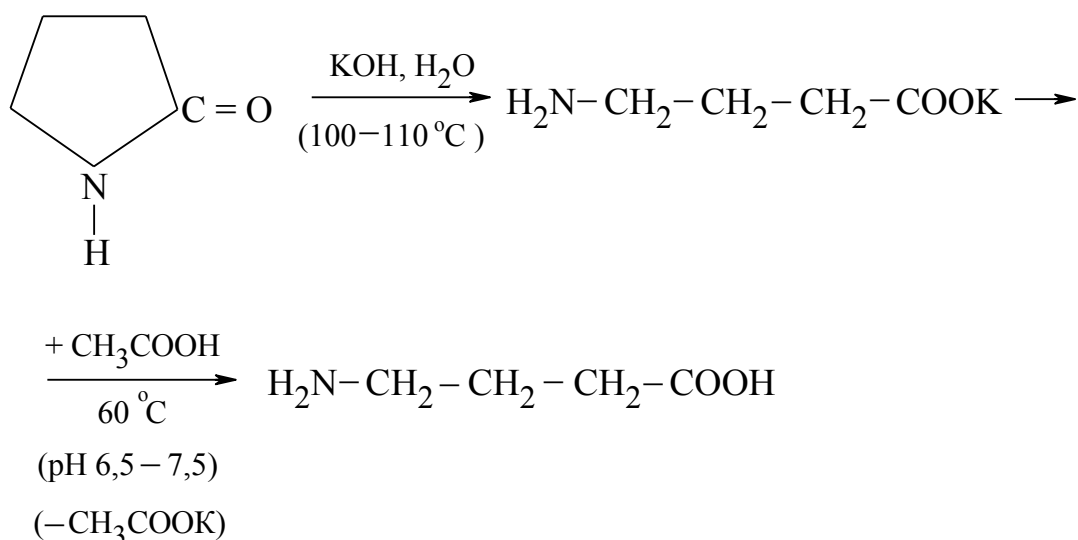
Метаболизм ГАМК происходит под действием фермента 4-аминобутират-2-оксиглутарат-аминотрансферазы в присутствии пиридоксальфосфата.

Глутамат и ГАМК –нейромедиаторы. ГАМК ингибирует, глутамат активирует передачу нервных импульсов. При выбросе ГАМК в синаптическую щель происходит активация ионных каналов ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>C</sub>-рецепторов, приводящая к ингибированию нервного импульса.

Лиганды рецепторов ГАМК рассматриваются как потенциальные средства для лечения различных расстройств психики и ЦНС, к которым относятся болезни Паркинсона и Альцгеймера, расстройства сна (бессонница, нарколепсия), эпилепсия.

ГАМК (GABA) – биогенный амин, восстанавливает процессы метаболизма в мозге, способствует утилизации глюкозы мозгом и удалению из него токсичных продуктов обмена, обеспечивает нормализацию динамики нервных процессов в головном мозге. Повышает продуктивность мышления, улучшает память, оказывает мягкое стимулирующее действие [25, 38].

ГАМК получают гидролизом α-пирролидона (промышленного сырья) по схеме:



Гидролиз ведут стехеометрическим количеством раствора КОН при 100–110 °С. Массу разбавляют спиртом и получают раствор калиевой соли, которую нейтрализуют уксусной кислотой при 60 °С (рН 6,5–7,5). Реакционную смесь охлаждают рассолом при 5–10 °С, кристаллический продукт фильтруют, промывают спиртом. Для получения фармакопейного продукта осветляют водный раствор при 70 °С активированным углем.

Впервые γ-аминомасляную кислоту обнаружили в мозге Е. Робертс и С. Френкель в 1950 году. Главное свойство ГАМК открыл английский ученый К. Крневич в 1963 году. Он изучил электрические потенциалы, которые возникают в соответствующих участках коры головного мозга. Получены данные, что ГАМК в большинстве моделей обладает противоопухолевой активностью. Показано взаимосвязь между общим состоянием ЦНС, частотой и множественностью опухолей и течением опухолевой болезни.

#### **4.2. Синтез комплексных солей γ-аминомасляной кислоты щелочных и щелочноземельных металлов (лития, магния, кальция) и их свойства**

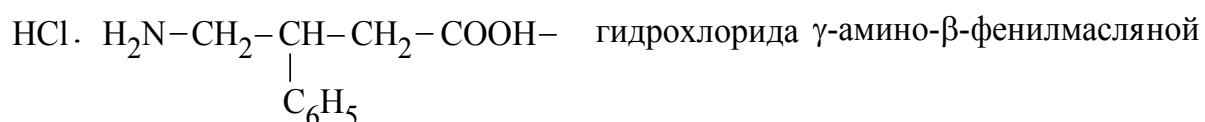
На основе ГАМК создан ряд лекарственных препаратов. Например, аминалон (отечественный препарат), гаммалон (Япония), применяемый при нарушениях мозгового кровообращения после инсульта, при атеросклерозе мозговых сосудов, потере памяти, при лечении нервно-психических заболеваний.

Аминалон–КВ (Aminalon–KV) имеет состав одной капсулы: 0,25 г  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, другие составляющие – метилцеллюлоза, кальция стеарат.

Аминалон–КВ относится к фармакотерапевтической группе психостимулирующих и ноотропных средств.

Фармакодинамика – нейрометаболический эффект препарата обусловлен преимущественно стимулированным влиянием на ГАМК-ергичную систему, что обеспечивает нормализацию динамики нервных процессов. Под влиянием ГАМК активизируются также энергетические процессы мозга, повышается дыхательная активность, улучшается кровоснабжение тканей мозга.

Структура ГАМК лежит в основе транквилизатора фенибута,



кислоты. На основе производных ГАМК разработаны лекарственные средства: соединения РГПУ-147 (цитрат 4-амино-3-фенил-бутановой кислоты, цитрокард), обладающие выраженным ноотропным, нейропротекторным и анксиолитическим действием.

На основе ГАМК и пантотеновой кислоты получено лекарственное средство пантогам – кальцевая соль *D* –(+)- $\alpha$ ,  $\gamma$ -диокси- $\beta$ ,  $\beta$ -диметилбутирил-аминомасляная кислота, относится к ноотропным препаратам с широким клиническим применением. Пантогам обладает нейропротекторным, нейротрофическим и нейрометаболическими свойствами. Сочетает умеренное седативное действие с мягким психостимулирующим эффектом и противосудорожной активностью. Пантогам усиливает процессы торможения в ЦНС, уменьшает потребность организма в кислороде и энергетических субстратах, усиливает синтез нуклеиновых кислот и белка, повышает содержание в организме стероидов. По анаболическому действию пантогам превосходит пантотеновую кислоту, обладая еще противосудорожным и гипотензивным свойствами.

Разработаны ноотропные средства, представляющие собой (*RS*)-*N*-пантоил- $\gamma$ -аминомасляную кислоту и ее соли (Na, K, Ca, Mg, Zn), которые могут быть использованы в медицинской практике (неврологии и психиатрии).

Например, Ca-соль получают по схеме: на этилат кальция действуют ГАМК, а затем на реакционную смесь – (*RS*) – пантолактоном при нагревании. Mg-соль получают следующим образом: к ГАМК в метаноле

прибавляют MgO при нагревании до кипения, фильтруют и на фильтрат действуют *RS*-пантолактоном при нагревании [46].

Предложен способ получения кальциевой соли *D*-гомопантотеновой кислоты с целью приготовления лекарственных форм препарата, обладающих ноотропным действием и высокой эффективностью при лечении умственной отсталости у детей. Способ осуществляется путем обработки ГАМК соединениями кальция в растворителе с последующей конденсацией кальциевой соли ГАМК с *D* – (+) – пантолактоном при нагревании в среде растворителя. В качестве соединения кальция применяют изопропилат кальция, который получают взаимодействием изопропонола с металлическим кальцием. Изопропилат кальция и Са-соль ГАМК из реакционной смеси не выделяют [47].

Предложен способ повышения стрессустойчивости животных с использованием литиевых солей ГАМК и оксиглицина. Данные препараты эффективно препятствуют неблагоприятному воздействию стресса на организм животных, повышают стрессустойчивость и адаптогенность. Изучены их физико-химические свойства, острая и хроническая токсичность (4 класс токсичности). Парентеральное введение ГАМК в количестве от 15 до 30 мг /кг массы тела животного предотвращает развитие стрессовых реакций, смягчает и ликвидирует их последствия [48].

Одноразовая внутрибрюшинная инъекция в постстрессовый период субэффективной дозы литиевой соли ГАМК нормализует содержание *L*-аргинина в цитозоле и митохондриях и предотвращает стимулирование системы (iNOS / NO) в цитозоле и митохондриях гиппокампа и способствует восстановлению активности (с NOS) в гипоталамусе.

В головном мозге функционируют основные изоформы синтазы (NOS). Кальцийзависимые, «конститутивная» (с NOS), участвующая в механизмах нейротрансмиссии, регулирующая мозговой кровоток. Кальцийнезависимые, «индуцибельная» (iNOS), функционирующая в рамках врожденного иммунитета.

Хронический стресс – индуцированное депрессивноподобное состояние сопровождается повышенным содержанием *L*-аргинина и сопряженным стимулированием (iNOS) и продукции NO (и его стабильных метаболитов:  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ), а также подавлением активности (с NOS) в цитозоле и митохондриях гиппокампа и гипоталамуса (Н.С. Назарян, С.А. Казарян, Н.О. Мовсесян и др.).



Для синтеза литиевой соли ГАМК используют следующую методику [49]. Первоначально получают гидроксид лития действием на сульфат лития смесью гидроксидами натрия и калия. Затем к суспензии гидроксида лития прибавляют водный раствор ГАМК и упаривают при 45 °С в течение 6,5 часов с помощью роторного испарителя под вакуумом. Остаток обрабатывают этанолом и получают целевой продукт с высоким выходом. Литиевая соль ГАМК имеет температуру плавления 209 °С (с разл.), хорошо растворяется в воде.

Из литературных сведений следует, что соли ГАМК (Ca, Mg, Li) являются эффективными ноотропными средствами и используются в медицинской и ветеринарной практике. Однако способы их получения нетехнологичны. Соли ГАМК кальция и магния из реакционной смеси не выделены. В связи с этим, нами проведены экспериментальные исследования по разработке рационального способа получения солей лития, кальция, магния ГАМК, по выделению их в индивидуальном виде и изучению физико-химических свойств [49].

Способ получения солей ГАМК щелочных и щелочноземельных металлов основан на классической реакции нейтрализации.

Действием на водный раствор ГАМК гидроксидами металлов получают соли: литиевую (схема I), магниевую и кальциевую (схема II).

Схема I.

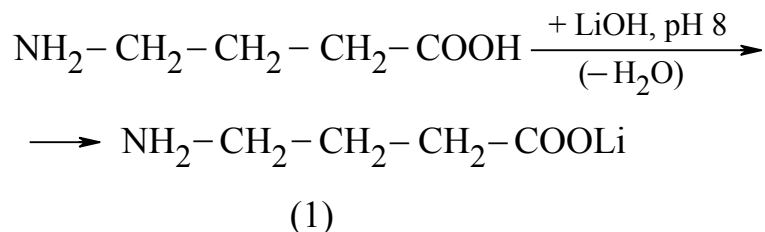
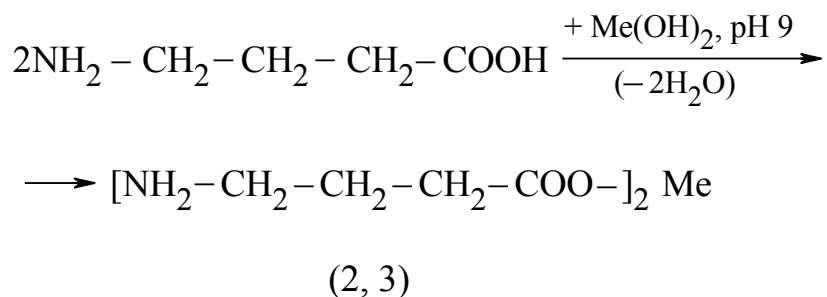


Схема II.



где Me = Mg<sup>2+</sup> (2); Ca<sup>2+</sup> (3).

При эквимольном соотношении субстрата и реагента (1 : 1) (схема I) и при прибавлении кристаллического гидроксида лития к водному (10 %-ному) раствору ГАМК (рН реакционного раствора 8) реакция протекает в гомогенной фазе. В мягких условиях, температура реакции

40–45 °С, время 20 минут, литиевую соль ГАМК получают с выходом ~ 90 % в виде блестящих белых кристаллов. Температура начала разложения 186 °С, температура обугливания – 210 °С. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При необходимости соль можно легко очистить от труднорастворимого гидроксида лития.

Для подтверждения структуры литиевой соли ГАМК проведены качественные реакции на аминокруппу. При действии на водный раствор литиевой соли ГАМК хлоридом железа (III) образуется хелат красного цвета, сульфатом меди (II) в слабокислой среде с добавлением ацетата натрия – хелат ярко синего цвета, раствором нингидрина наблюдается окрашивание в желтый цвет, который быстро переходит в фиолетовый. Магниевою и кальциевую соли ГАМК получают действием на водный раствор ГАМК гидроксидами соответствующих металлов, взятых в двухкратном избытке. Реакция протекает в гетерогенной фазе. В оптимальных условиях, pH реакционного раствора 9–10, температура 55–60 °С, время 35–40 минут, целевые продукты получают с выходами более 70 %. Невступившие в реакцию гидроксиды (магния и кальция) выделяют и используют в следующих опытах.

Соли ГАМК магния (т. пл. 85–86 °С) и кальция (т. пл. 96–97 °С) хорошо растворяются в воде (pH водных растворов 8), не растворяются в спирте.

Структура солей подтверждена качественными реакциями на NH<sub>2</sub>-группу, на ионы Mg<sup>2+</sup> с гидроксидом натрия, на ионы кальция с оксалатом аммония, соответственно.

### **Методики синтеза солей γ-аминомасляной кислоты лития, магния, кальция**

Для синтеза солей γ-аминомасляной кислоты были использованы следующие реактивы: γ-аминомасляная кислота – SiGMA–ALDLCh CheMiH GmbH USA, содержание основного вещества ≥ 99 %; гидроксиды лития, магния, кальция марки «хч».

#### **1. Синтез литиевой соли γ-аминомасляной кислоты**

К раствору 1 г (0,0097 моль) ГАМК в 10 мл воды (pH 6) прибавляют 0,4 г (0,0097 моль) LiOH · H<sub>2</sub>O, перемешивают до полного растворения (7 минут). Гомогенный раствор (pH 8) нагревают до 40–45 °С в течение 20–25 минут, выдерживают при комнатной температуре 1,5–2 часа, фильтруют от незначительного количества темно-бурой взвеси. Прозрачный раствор упаривают из чашки Петри при комнатных условиях,

остаток промывают несколько раз этанолом и сушат. Получают 0,9 г (89, 55 %) литиевой соли ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]\text{Li}$ .

Литиевая соль ГАМК – белые блестящие кристаллы, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре 186 °С наблюдается начало разложения, при 210 °С – полностью обугливание.

## **2. Синтез магниевой соли $\gamma$ -аминомасляной кислоты**

К раствору 1 г (0,0097 моль) ГАМК в 10 мл воды прибавляют 0,56 г (0,0097 моль) гидроксида магния при перемешивании. Реакционную гетерогенную смесь нагревают до 55–60 °С в течение 35–40 минут (рН 9–10). Горячую суспензию фильтруют от невступившего в реакцию гидроксида магния. Гомогенный прозрачный фильтрат упаривают при комнатной температуре, кристаллический остаток промывают этанолом и сушат. Получают 0,9 г (70,5 %) дигидрата магниевой соли ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]_2\text{Mg} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Дигидрат магниевой соли ГАМК белые блестящие кристаллы с бирюзовым оттенком, хорошо растворяются в воде (рН раствора 8), в спирте, ацетоне не растворяются. Температура плавления дигидрата 85–86 °С

## **3. Синтез кальциевой соли $\gamma$ -аминомасляной кислоты**

К раствору 1 г (0,0097 моль) ГАМК в 10 мл воды прибавляют 0,7 г (0,0097 моль) гидроксида кальция при перемешивании. Реакционную смесь нагревают до 55–60 °С в течение 35–40 минут (рН 9–10). Горячую суспензию фильтруют от осадка гидроксида кальция. Гомогенный фильтрат упаривают при комнатной температуре, кристаллический остаток промывают этанолом и сушат. Получают 0,85 г (71,43 %) кальциевой соли ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]_2\text{Ca}$ .

Кальциевая соль ГАМК – белые блестящие кристаллы. Продукт хорошо растворяется в воде (рН раствора 8), не растворяется в спирте, ацетоне. Температура плавления 96–97 °С.

Данные анализов солей  $\gamma$ -аминомасляной кислоты щелочных и щелочноземельных металлов (лития, магния, кальция) приведены в табл. 6.

В результате экспериментальных исследований разработан рациональный способ получения солей  $\gamma$ -аминомасляной кислоты с гидроксидами лития, магния и кальция. Показано, что способ их синтеза основан на классической реакции нейтрализации. В результате исследований выявлены факторы, влияющие на протекание реакции:

технологические приемы смешивания субстрата и реагента, их соотношение, pH реакции, гомогенность реакционной смеси, температурные режимы. В оптимальных условиях целевые продукты получают с хорошими выходами, что позволяет проводить дальнейшее исследование их биологической активности в медицинской и ветеринарной практике.

#### **4.3. Синтез комплексных солей $\gamma$ -аминомасляной кислоты двухвалентных 3d-металлов (марганца, меди, цинка) и их свойства**

$\gamma$ -Аминомасляная кислота (ГАМК) – важнейший тормозной нейромедиатор центральной нервной системы (ЦНС) человека и млекопитающих. Введение ГАМК вызывает тормозной процесс в коре головного мозга человека (центральное торможение), а у животных приводит к утрате условных рефлексов [25].

Известно, что соединения биогенных металлов с аминокислотами (хелаты) представляют особый интерес для использования в животноводстве. Использование хелатных соединений повышает уровень усвоения микроэлементов (цинка, меди, железа и марганца).

Изучена гипогликемическая активность цинковых солей  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, оротовой,  $\epsilon$ -аминокапроновой, *N*-ацетил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислот в опытах на крысах с аллоксановым диабетом. Показано, что цинковые соли данных кислот обладают гипогликемическим (сахароснижающим) действием. Исследуемые цинковые соли были синтезированы в лаборатории органического синтеза ВНИЦ БАВ.

Разработаны ноотропные средства на основе (*RS*)-*N*-пантоил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты и ее солей (в том числе цинковой соли), которые могут быть использованы в медицинской практике (неврологии и психиатрии). Цинковую соль авторы [46] получают действием на кальциевую соль (*RS*)-*N*-пантоил- $\gamma$ -аминомасляной кислоты в водно-спиртовой среде водным раствором сульфата цинка с последующей выдержкой в течение 36 часов при комнатной температуре.

Цинк – очень важный микроэлемент, обладающий антиоксидантными свойствами, нормализует обмен веществ, регулирует деятельность репродуктивной системы. Он играет важную роль в процессах кроветворения, в поддержании нормативной работы иммунной системы и деятельности желез внутренней секреции, активизирует деятельность головного мозга.

$\gamma$ -Аминомасляная и  $\varepsilon$ -аминокапроновая кислоты образуют комплексы хелатного характера с солями меди, имеющие темно-синюю окраску. Хелатный комплекс меди используется в качестве источника микроэлемента меди. Медь играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях и защите организма от воздействия свободных радикалов. Медь – функциональный компонент ряда важнейших ферментов (в том числе лизинооксидазы). Недостаток меди приводит к диминерализации костной ткани. Медь играет важную роль в процессах биосинтеза гемоглобина. Недостаток меди как и железа, может привести к возникновению анемии.

Железодефицитная анемия – наиболее распространенное заболевание нашего времени. Дефицит железа в организме приводит к снижению уровня гемоглобина в периферической крови. К развитию железодефицитной анемии приводит также недостаточность микроэлементов, среди которых наиболее важна медь, участвующая в процессе кроветворения, в синтезе гемоглобина.

Важное значение в повышении биологической доступности минеральных веществ и обеспеченности организма микроэлементами имеют хелатные соединения. Авторы [50] исследовали влияние тирозината меди на количественное распределение железа и меди в органах и тканях на фоне постгеморрагической анемии у белых крыс. Проведен направленный синтез комплексного соединения тирозина с медью и изучена реакция с сульфатом меди (II) в кислой среде. Показано, что хелат-комплекс меди с тирозином способствует повышению статуса меди в органах и тканях белых крыс и увеличению отложения металла в тканевых депо.

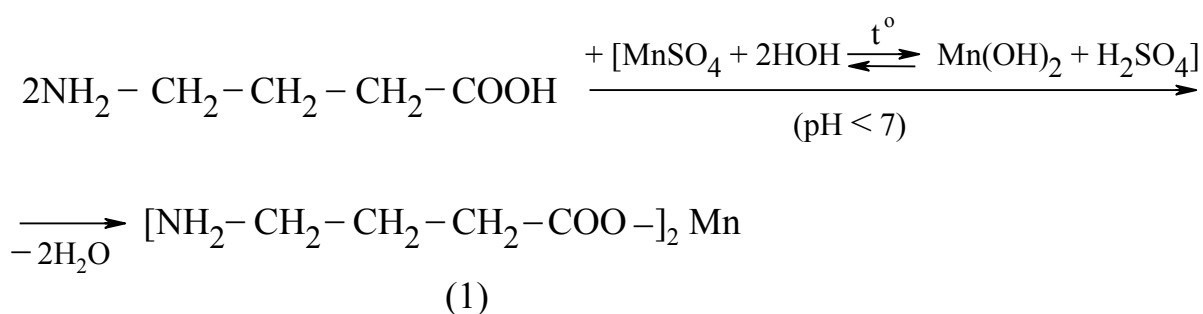
Аминокислотный хелат марганца – доступная форма марганца, микроэлемента, необходимого для развития скелета, укрепления суставов, костей и мышечных тканей.

Марганец необходим для людей с анемией на фоне недостаточности железа.

Из анализа литературных данных следует, что лекарственные средства, включающие ГАМК и биогенные металлы (в том числе цинк и медь) являются эффективными препаратами и используются в медицинской и ветеринарной практике. В доступной литературе отсутствуют сведения о методах синтеза комплексонов ГАМК марганца, меди, цинка и их физико-химических свойствах.

С целью изучения их биологической активности нами проведены экспериментальные исследования по разработке способов получения комплексонатов, выделению их в индивидуальном виде и определению физико-химических свойств [51].

Комплексонат марганца (II)  $\gamma$ -аминомасляной кислоты получают действием на реакционный водный раствор гидролизата сульфата марганца (II)  $\gamma$ -аминомасляной кислотой в кислой среде (pH 3) [51]. Реакция протекает по схеме:



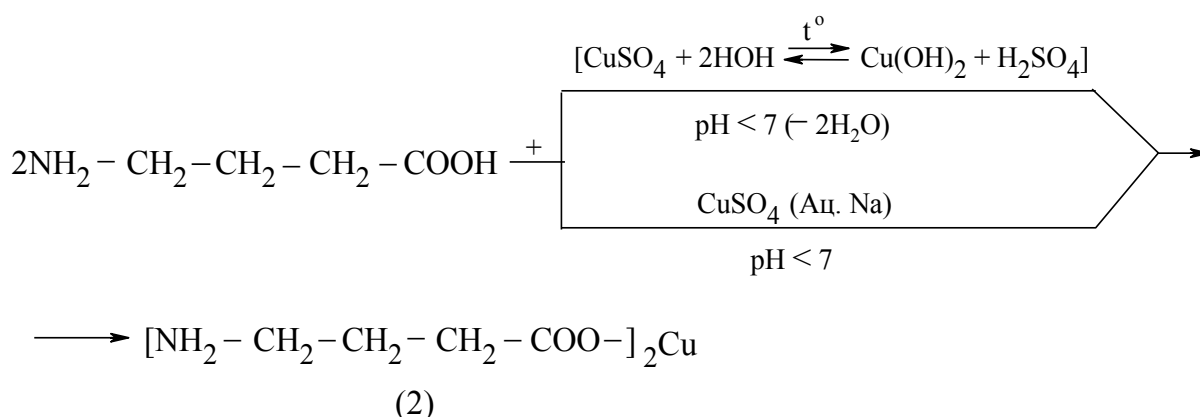
Реакция проводится в гомогенной кислой среде и образующийся в процессе гидролиза  $\text{Mn(OH)}_2$  не подвергается окислению. При температуре реакции 45 °С, времени 30–35 минут и последующей выдержки 2 часа (комнатная температура) комплексонат марганца (II) ГАМК дигидрат получают с выходом 92 % в виде кристаллов розоватого цвета. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. Плавится при температуре 132–133 °С.

Структура комплексоната марганца (II) ГАМК подтверждена качественными реакциями на  $\text{NH}_2$ -группу: с хлоридом железа (III) образуется хелат красного цвета; с сульфатом меди (II) в слабокислой среде с добавлением ацетата натрия – хелат ярко синего цвета; с раствором нингидрина наблюдается окрашивание в фиолетовый цвет.

Качественная реакция на ионы  $\text{Mn}^{2+}$ : при действии водного раствора гидроксида натрия на водный раствор комплексоната марганца (II) ГАМК выпадает бледно-розовый осадок  $\text{Mn(OH)}_2$ , который быстро переходит в  $\text{MnO(OH)}_2$  – осадок темно-бурого цвета.

Комплексонат меди (II) ГАМК получают в кислой среде двумя методами: (2а) – действием на ГАМК сульфатом меди (II) и ацетатом натрия (pH 5) [51]; (2б) – действием на гомогенный раствор гидролизата меди (II) (pH 3) ГАМК.

Реакция протекает по схеме:



При соотношении субстрата и реагента (2 : 1) в молях (методы 2а, 2б) в кислой среде реакция протекает в гомогенной фазе. В мягких условиях комплексонат меди (II) ГАМК получают с выходом 70–71 % в виде игольчатых кристаллов голубого цвета с температурой плавления 133–134 °С.

Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. Очищается высаживанием из водного раствора этанолом.

Структура комплексоната меди (II) ГАМК подтверждена качественными реакциями: на  $\text{NH}_2$ -группу с  $\text{FeCl}_3$  образуется хелат красного цвета; на ионы  $\text{Cu}^{2+}$  с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образуется осадок  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  красно-бурого цвета.

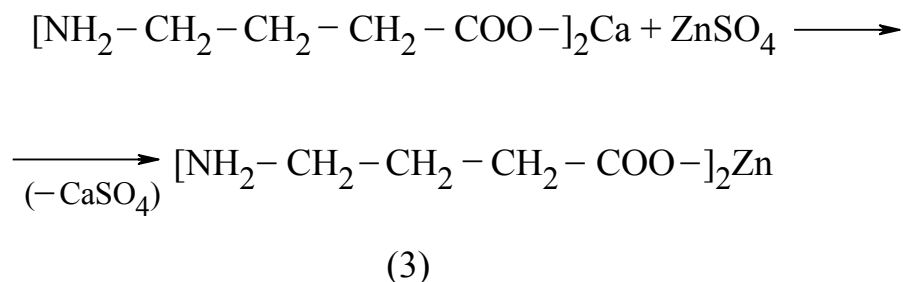
Реакция комплексообразования ГАМК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в щелочной среде менее технологична. При действии на реакционную смесь ГАМК и гидроксида натрия сульфатом меди (II) первоначально происходит выпадение труднорастворимого осадка  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , процесс переходит в гетерогенную фазу и выход целевого продукта снижается.

Аналогично протекает реакция комплексообразования ГАМК с ионами цинка в щелочной среде. Первоначально выпадает обильный осадок труднорастворимого осадка  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ , что затрудняет выделение комплексоната цинка ГАМК.

Для синтеза комплексоната цинка ГАМК в качестве субстрата нами использована кальциевая соль ГАМК [49] и реагента сульфат цинка [51].

Реакция протекает в водной среде в гомогенной фазе:

Схема реакции:



При эквимольном соотношении субстрата и реагента в мягких условиях получают комплексонат цинка ГАМК с выходом  $\approx 64\%$  в виде белых кристаллов. Продукт хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, ацетоне. При температуре  $210\text{--}212^\circ\text{C}$  наблюдается разложение комплексоната цинка ГАМК. Структура комплексоната цинка ГАМК подтверждена качественными реакциями: на  $\text{NH}_2$ -группу (реакции с  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ); на ионы  $\text{Zn}^{2+}$  с  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , образуется желто-коричневый осадок  $\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ ; с  $\text{NaOH}$  – выпадает белый гелеобразный осадок  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ .

Выпавший из реакционной смеси осадок  $\text{CaSO}_4$  дает качественные реакции: на  $\text{Ca}^{2+}$  с оксалатом аммония – осадок  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  и на  $\text{SO}_4^{2-}$  с хлоридом бария – осадок  $\text{BaSO}_4$ .

### Методики синтеза комплексонатов $\gamma$ -аминомасляной кислоты марганца, меди, цинка

#### 1. Синтез комплексоната марганца (II) $\gamma$ -аминомасляной кислоты

Раствор  $1,17\text{ г}$  ( $0,00485$  моль) сульфата марганца (II),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в  $15\text{ мл}$  воды ( $\text{pH } 4$ ) нагревают до  $45\text{--}50^\circ\text{C}$  в течение  $20$  минут. К гомогенному раствору гидролизата ( $\text{pH } 3$ ) прибавляют  $1\text{ г}$  ( $0,0097$  моль) ГАМК, нагревают реакционную смесь до  $45^\circ\text{C}$   $30$  минут и выдерживают при комнатной температуре  $2$  часа. Затем гомогенный раствор упаривают, остаток промывают этанолом и кристаллизуют. Получают  $1,31\text{ г}$  ( $92,0\%$ ) комплексоната дигидрата марганца (II) ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]_2\text{Mn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Дигидрат комплексоната марганца (II) ГАМК кристаллический продукт светло-розового цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре  $130\text{--}132^\circ\text{C}$  плавится (протекает дегидратация), при  $178^\circ\text{C}$  наблюдается начало разложения,  $190^\circ\text{C}$  – обугливание.



## **2. Синтез комплексоната меди (II) $\gamma$ -аминомасляной кислоты**

а) К раствору 0,5 г (0,00485 моль) ГАМК в 10 мл воды прибавляют 0,58 г (0,0024 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,18 г (0,0022 моль) ацетата натрия и выдерживают при комнатной температуре в течение 2–3 часов. Гомогенный раствор (pH 5) ярко синего цвета упаривают, остаток растворяют в воде и высаживают этанолом. Выпавшие игольчатые голубые кристаллы отфильтровывают, промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 0,52 г (71,23 %) комплексоната дигидрата меди (II) ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Дигидрат комплексоната меди (II) ГАМК игольчатые кристаллы голубого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 134 °С наблюдается разложение.

б) Раствор 0,58 г (0,0024 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 10 мл воды (pH 4) нагревают до 35–40 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (pH 3) прибавляют 0,5 г (0,00485 моль) ГАМК и перемешивают до полного растворения. Полученный гомогенный реакционный раствор ярко синего цвета выдерживают при комнатной температуре в течение трех часов и упаривают. Кристаллический остаток растворяют в воде, высаживают этанолом, фильтруют, промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 0,51 г (70,0 %) комплексоната дигидрата меди (II) ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  в виде голубых кристаллов с температурой плавления 133–134 °С.

## **3. Синтез комплексоната цинка $\gamma$ -аминомасляной кислоты**

К раствору 0,5 г (0,002 моль) кальциевой соли ГАМК в 10 мл воды (pH 8) прибавляют раствор 0,57 г (0,002 моль) сульфата цинка,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 5 мл воды. Реакционную смесь перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 4–5 часов. Наблюдается выпадение осадка сульфата кальция, который фильтруют и сушат. Осадок дает качественную реакцию на катионы кальция с оксалатом аммония и на сульфат-анионы с хлоридом бария. Гомогенный фильтрат после отделения сульфата кальция упаривают, белый кристаллический остаток промывают этанолом и сушат. Получают 0,21 г (63,63 %) комплексоната цинка ГАМК,  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}]_2\text{Zn}$ . Комплексонат цинка ГАМК – белый кристаллический продукт, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 210–212 °С

продукт разлагается. Температура плавления субстрата (кальциевой соли ГАМК) 96–97 °С.

Данные анализов комплексонов  $\gamma$ -аминомасляной кислоты двухвалентных 3d-металлов (марганца, меди, цинка) приведены в табл. 6.

Экспериментально исследована реакция комплексообразования  $\gamma$ -аминомасляной кислоты с ионами марганца (II), меди (II), цинка. Показано, что способ синтеза комплексонов Mn (II), Cu (II) ГАМК основан на использовании в качестве реагентов гидролизатов сульфатов соответствующих металлов в кислой среде. Способ получения комплексона цинка ГАМК основан на реакции замещения при действии на кальциевую соль ГАМК сульфатом цинка.

В результате экспериментальных исследований выявлены факторы, влияющие на процесс комплексообразования: технологические приемы смешивания субстрата и реагента, их соотношение, гомогенность реакционной смеси, pH реакции, температурные режимы. В оптимальных условиях целевые продукты получают с хорошими выходами, что позволяет проводить изучение их биологических свойств.

Таблица 6

Данные анализов комплексных солей  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК)

№ соединения	Брутто формула	Название соединения	Выход %	Содержание % N		Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
				Найдено	Вычислено				
4.2 (1).	[C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N]Li	Литиевая соль ГАМК	89,55	12,71	12,84	Белый	186 (н. разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – фиолетовое окрашивание
4.2 (2).	[C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Mg · 2H <sub>2</sub> O	Магниева соль ГАМК (дигидрат)	70,50	10,48	10,60	Белый с бирюзовым оттенком	85–86	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – желтое окрашивание; NaOH (Mg <sup>2+</sup> )
4.2 (3).	[C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Ca	Кальциевая соль ГАМК	71,43	10,88	11,06	Белый	96–97	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – желтое окрашивание; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (Ca <sup>2+</sup> )
4.3 (1)	[C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Mn · 2H <sub>2</sub> O	Комплексонат Mn (II) ГАМК (дигидрат)	92,00	10,70	10,81	Бледно-розовый	130–132	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); нингидрин – фиолетовое окрашивание NaOH (Mg <sup>2+</sup> )
4.3 (2)	[C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Cu · 2H <sub>2</sub> O	Комплексонат Cu (II) ГАМК(дигидрат)	71,23	9,10	9,21	голубой	133–134	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> ) Cu <sup>2+</sup> (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])
4.3 (3)	[C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N] <sub>2</sub> Zn	Комплексонат цинка ГАМК	63,63	10,28	10,40	Белый	210–212 (разл.)	х.р.	NH <sub>2</sub> -гр.(FeCl <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> +Ац.На); Zn <sup>2+</sup> (NaOH; K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])

Сокращения: н. разл. – начало разложения; разл. – разложение; х.р. – хорошо растворяется.

## ГЛАВА 5. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

### 5.1. Физико-химические и биологические свойства аскорбиновой кислоты

Аскорбиновая кислота (2,3-дидегидротрео-гексоно-1,4-лактон) может быть отнесена к производным углеводов. Молекула аскорбиновой кислоты содержит два асимметрических атома углерода в положении 4 и 5 и образует четыре оптических изомера и два рацемата. Оптические изомеры *D*- и *L*-аскорбиновые кислоты и их диастереоизомеры-*D* и *L*-изаскорбиновые кислоты. Природная биологически активная аскорбиновая кислота имеет *L*-конфигурацию. *D*-аскорбиновая и *L*-изаскорбиновые кислоты в природе не встречаются и получены только синтетическим путем.

***L*-аскорбиновая кислота.** Брутто формула  $C_6H_8O_6$ ,  $M_m = 176,13$ . Кристаллическое вещество белого цвета моноклинической системы. Температура плавления  $192\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Оптически активна –  $[\alpha] 20 \div 23^{\circ}$  в воде. УФС в кислой водной среде имеет максимум при 245 нм, в щелочной среде максимум сдвигается к 265 нм. Это свидетельствует о наличии сопряженной системы двойных связей. Аскорбиновая кислота хорошо растворима в воде: при  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 13,5 %, при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 22,42 %, при  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 57,51 %, растворимость 33,3 г / 100 мл воды ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Хуже растворяется в этаноле, мало растворима в ацетоне, не растворима в эфире.

В водных растворах аскорбиновая кислота дает кислую реакцию (для 0,1 н раствора рН 2,2) и обычно реагирует как одноосновная кислота.

Лактоны нейтральны и потому кислые свойства аскорбиновой кислоты обусловлены главным образом гидроксильной группой в положении 3. Частично за кислую реакцию ответственна гидроксильная группа в положении 2. Константа диссоциации составляет:  $pK_1 4,17$ ;  $pK_2 11,57$ .

При действии сильных щелочей  $\gamma$ -лактоновое кольцо гидролитически размыкается с образованием соли кетокислоты. Со слабыми щелочами аскорбиновая кислота образует нейтральные монощелочные еноляты без размыкания лактонного кольца.

Аскорбиновая кислота обладает сильными восстановительными свойствами. Наличие в аскорбиновой кислоте сопряженных двойных связей обуславливает ее способность к обратимому окислению, продуктом которого является дегидроаскорбиновая кислота (ДАК) (бесцветные кристаллы, температура плавления  $222\text{--}225\text{ }^{\circ}\text{C}$ , хорошо растворимы в воде).

При взаимодействии аскорбиновой кислоты с раствором  $\text{AgNO}_3$  протекает реакция окисления до ДАК. При этом ионы серебра восстанавливаются до элементного состояния (реакция серебряного зеркала).

Аскорбиновая кислота обесвечивает иод, раствор  $\text{KMnO}_4$ , реагирует с реактивом Фелинга, восстанавливает нитраты до нитритов. [refs ru. com > referat-7623-2.html; Аскорбиновая кислота. Химические и физические свойства витамина С. Электронная медицина].

L-аскорбиновая кислота восстанавливает окисленные формы ферментов, окисляясь в ДАК, обратимо легко регенерирующуюся в аскорбиновую кислоту под действием глутатиона (трипептида) за счет его сульфогидрильной группы. Окисление аскорбиновой кислоты катализируется ионами меди, в меньшей степени – ионами серебра и железа.

Специфическим катализатором окисления аскорбиновой кислоты в животных организмах является медьсодержащий белок, обладающий оксидазной активностью – церулоплазмин. Многие белки ингибируют окисление аскорбиновой кислоты путем ее связывания или образования комплексов с медью.

Аскорбиновая кислота принимает участие в некоторых важных окислительных процессах, например в качестве второго донора электронов при окислении остатков пролина в проколлагене до гидроксипролина. При этом она превращается в ДАК, которая восстанавливается до аскорбата с помощью специальной редуктазы. Аскорбиновая кислота активизирует синтез коллагена, который является одним из компонентов соединительной ткани. Аскорбиновая кислота оказывает защитное действие на компоненты клетки от действия свободных радикалов. Роль мощного антиоксиданта – одна из основных для аскорбиновой кислоты (витамина С).

Синтез гормонов надпочечников, в частности адреналина и норадреналина, также затруднены без аскорбиновой кислоты. Эти гормоны оказывают воздействие на адаптационные возможности организма. Аскорбиновая кислота способствует здоровому функционированию митохондрий, стимулирует иммунную систему для производства интерферона.

Витамин С содействует преобразованию аминокислот в нейротрансмиттеры, снижает окислительное повреждение генов.

Исследования показали, что имеется связь заболеваемости раком и уровнем витамина С в организме человека и животных. Функции аскорбиновой кислоты в организме очень многообразны и связаны с ее важнейшим химическим свойством – способностью к окислительно-восстановительным реакциям [25, 37, 38].

Антиканцерогенный эффект аскорбата связан, прежде всего с его способностью обезвреживать химические канцерогены, ингибировать свободно-радикальные процессы, ведущие к развитию рака, а также со стимуляцией иммунитета. Аскорбиновая кислота предупреждает образование в желудке нитрозаминов, являющихся сильнейшими канцерогенами.

Имеются данные об эффективности приема аскорбиновой кислоты как средства профилактики рака желудка. Обнаружен также положительный эффект больших доз витамина С (100 мг / кг) при лечении лейкозов, что связано прежде всего с антиоксидантной функцией аскорбата.

Лучший эффект получают при одновременном приеме трех основных антиоксидантов – витаминов С, Е и А.

В НИИ онкологии и медицинской радиологии МЗ Беларуси с успехом применяют антиоксидантный комплекс при лечении рака желудочно-кишечного тракта (В.Н. Суколинский и сотрудники)

Внутривенное введение при раке яичников высоких доз витамина С в комплексе со стандартной химиотерапией снижает токсичный эффект последней и способствует уничтожению раковых клеток.

## **5.2. Синтез комплексных солей аскорбиновой кислоты двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства**

Аскорбиновая кислота важна для поддержания здоровья и нормального роста сельскохозяйственных животных как лекарственный препарат. Она назначается животным в профилактических и лечебных целях при гиповитаминозе С, нарушении обмена веществ, инфекционных болезнях и др.

В ветеринарной и медицинской практике в лечебных целях используются комплексные соединения аскорбиновой кислоты с биогенными металлами. В последние годы активно развивается медицинская микроэлементология, фармакология комплексных соединений на основе аминокислот, оксикетокислот, аскорбиновой кислоты и биогенных металлов.

Значительный интерес в этом плане представляют аскорбаты двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди и цинка).

Аскорбат марганца (II) необходимый препарат, который действует на рост и развитие некоторых соединительных тканей, необходимый кофактор в синтезе гликозаминогликанов. Проявляет положительный

эффект как антиоксидант. Хорошо абсорбируется из пищеварительного тракта, не проявляет побочное действие, не токсичный. Комбинация глюкозамина сульфата (ГС), хондроитина сульфата (ХС) и аскорбата марганца (II) используется в ветеринарии для лечения дегенеративных заболеваний суставов.

Изучена возрастная динамика минерального обмена и процессов формирования костной ткани у цыплят-бройлеров под влиянием хелатного комплекса аскорбата марганца (II). Показана положительная роль препарата на рост и развитие цыплят-бройлеров [52].

Аскорбат марганца (II) рекомендован в качестве кормовой добавки для кормления сельскохозяйственных животных и птицы. Препарат положительно влияет на протекание метаболических процессов в организме. Аскорбат марганца (II) производят на основе очищенного маточного раствора аскорбиновой кислоты и сульфата марганца в форме порошка [53].

Создан препарат «Инолтра» – хондропротектор нового поколения, в состав которого входят: ГС, ХС, ПНЖК (полиненасыщенные жирные кислоты), аскорбат марганца (II) [Производитель Vrwinn Naturals США].

Аскорбат железа (II) – наиболее эффективный препарат стабилизированного двухвалентного железа для лечения железодефицитной анемии. Изучены фармако-токсикологические свойства аскорбата железа (II). Показано, что препарат не токсичный, не обладает местнораздражающим, эмбриотоксичным, тератогенным и аллергическим действием. Способствует повышению содержания в крови эритроцитов и гемоглобина. Препарат рекомендован для профилактики железодефицитной анемии и С-гиповитаминоза сельскохозяйственной птицы. Синтез аскорбата железа (II) осуществляется в ООО «Полисинтез» (Белгород) путем обработки маточного раствора аскорбиновой кислоты карбонатом кальция и сульфатом закисного железа. Препарат представляет собой порошок от серого до черного цвета. Хорошо растворяется в воде [54].

Сообщается о получении аскорбата железа путем добавления к водному раствору аскорбиновой кислоты избытка  $\text{FeCO}_3$  с последующим осаждением препарата спиртом в виде темно-фиолетового порошка.

Предложено использовать аскорбат железа для кормления всех видов животных. Разработаны оптимальные дозы кормления. Препарат способствует приросту живой массы, улучшению качества продукции в птицеводстве и свиноводстве [55].

Комбинированный препарат железосульфат-аскорбиновая кислота восполняет недостаток железа в организме и улучшает его всасывание из ЖКТ. Препарат применяют для лечения и профилактики железодефицитной анемии.

С целью повышения продуктивности и сохранности поголовья сельскохозяйственных животных предложено включать в основной рацион кормления аскорбат кобальта (II) в количестве 200–2000 г на 1 т комбикорма.

Аскорбат кобальта (II) получают нейтрализацией очищенного раствора аскорбиновой кислоты карбонатом кобальта (II). Препарат представляет собой гранулированный порошок светло-коричневого цвета, не токсичный. По данным ИКС установлено, что соединение является хелатным комплексом [56].

Проведены исследования по выявлению физиолого-биологической роли аскорбата кобальта (II) при скормливаниях его цыплятам-бройлерам. Опыты, проведенные в условиях вивария Белгородской ГСХА, показали, что введение в комбикорма препарата в дозе 600 г/т, оказывает положительное влияние на содержание эритроцитов и гемоглобина в крови, а также на неспецифическую резистентность организма птицы [57].

Аскорбат цинка, как биогенный препарат, рекомендован в качестве кормовой добавки для кормления сельскохозяйственных животных и птицы. Препарат способствует повышению продуктивности и сохранности поголовья [58].

При взаимодействии аскорбата цинка с 1-этилимидазолом получен комплекс (брутто формула  $(C_{16}H_{22}N_4O_6Zn)$ ), который повышает устойчивость организма к действию диоксида азота и обладает цитопротекторным и антигипоксическим действием. Синтез аскорбата цинка при этом осуществляется действием водным раствором аскорбиновой кислоты на водную суспензию гидроксида цинка при 60 °С с последующим перемешиванием реакционной смеси в течение 6 часов при 50 °С. Невступившие в реакцию гидроксид цинка фильтруют, водный фильтрат упаривают в вакууме. Целевой продукт выделяют смесью ацетона и эфира с выходом 75,3 % в виде порошка желтого или желто-оранжевого цвета, растворимого в воде; температура плавления 104 °С [59].

Минеральные аскорбаты используются для лечения онкологических заболеваний и разработаны нормы их потребления: аскорбата цинка – 40 мг / сутки, аскорбата марганца – 11 мг / сутки. Для лечения рака используется пероральный способ приема витамина С и внутривенное введение аскорбатов металлов на двух стадиях: до удаления опухоли (первичная терапия) и после ее удаления. При содержании в плазме крови на уровне 350–400 мг / дл витамин С попадает в виде пролекарства в межклеточное пространство ткани, где он взаимодействует с ионами металлов в реакции Фентона, создавая значительное количество перекиси



водорода по всему межклеточному пространству. В результате этого раковые клетки уничтожаются. Из исследований Риордана следует, что опухолевые клетки становятся восприимчивыми к высокой дозе витамина С.

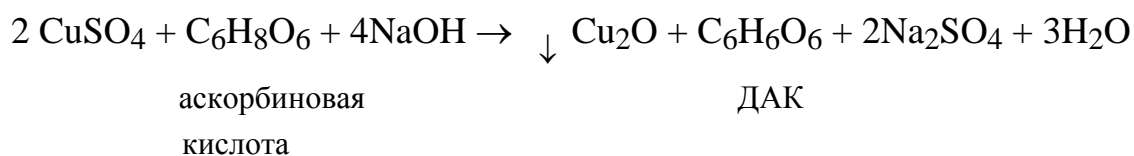
Изучена фармакология и токсикология аскорбатов марганца, железа, цинка. Установлено, что препараты не токсичные (классификация К.К. Сидорова) и рекомендованы в качестве лечебно-профилактических средств при гипомикроэлементозах и для повышения продуктивности животных [60].

Аскорбат цинка входит в состав БАД к пище для взрослых: *L*-аскорбиновая кислота, *L*-аскорбаты натрия, калия, кальция, магния, цинка, аскорбил-пальмитат.

Имеется сообщение об использовании аскорбата меди (II) для инактивации вирусов: простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегавируса и вируса пара-гриппа (Лечебные свойства витамина С против герпеса).

Методики синтеза аскорбата меди (II) в доступной литературе отсутствуют. Исследовалась реакция взаимодействия аскорбиновой кислоты с сульфатом меди (II) в щелочной среде. В данных условиях протекает окислительно-восстановительная реакция. Аскорбиновая кислота окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК), а ионы меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) восстанавливаются до ионов меди ( $\text{Cu}^{1+}$ ) с выпадением осадка красного цвета  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Схема реакции:



Учитывая высокую биологическую активность аскорбатов марганца, железа, кобальта, меди, цинка нами проведены экспериментальные исследования по изучению реакции комплексообразования, разработке технологичных способов их получения и изучению физико-химических свойств [61, 62].

Синтез аскорбатов Mn (II), Fe (II), Co (II) и цинка осуществляли взаимодействием аскорбиновой кислоты с гидроксидами соответствующих металлов. При этом учитывалась стабильность субстрата и реагентов в зависимости от pH реакционной среды. Аскорбиновая кислота ( $\gamma$ -лактон-2-оксо-*L*-гулоновая кислота) проявляет довольно сильные кислотные свойства ( $\text{pK}_1$  4,17), обусловленные диссоциацией гидроксильной группы в положении 3 эндиольного фрагмента. При действии сильных щелочей

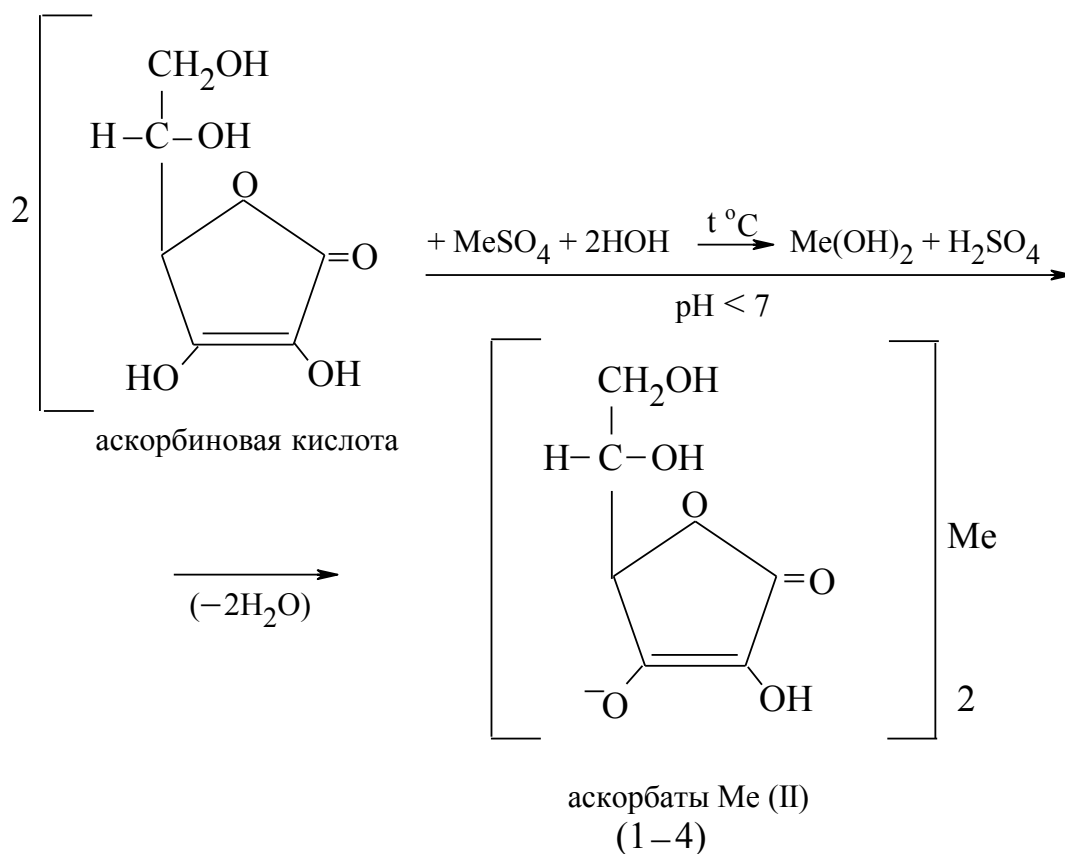
$\gamma$ -лактоновое кольцо размыкается. Со слабыми растворами щелочей кольцо не размыкается. При этом образуются однометалльные соли за счет замещения водорода гидроксильной группы при третьем атоме углерода. В кислой среде аскорбиновая кислота устойчива [38].

В качестве реагентов нами были использованы гидроксиды металлов, образованные в процессе гидролиза сульфатов. Сущность способа получения комплексонатов заключается в следующем: первоначально проводят гидролиз сульфатов металлов в водной среде (рН 2), а затем прибавляют субстрат. В процессе гидролиза образуются гидроксиды:  $\text{Mn}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Co}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ , соответственно.

Гидроксиды Me (II) (марганца, железа, кобальта) хорошо растворимы в кислой среде и не подвергаются быстрому окислению. В щелочной среде – нерастворимы и быстро окисляются до гидроксидов Me (III).

Реакция комплексообразования гидроксидов Me (II) с аскорбиновой кислотой протекает в гомогенной фазе в кислой среде. При температуре реакции 45–50 °С, время 30–35 минут целевые продукты получаются с выходами более 90 %.

Схема реакции:



где Me =  $\text{Mn}^{2+}$  (1);  $\text{Fe}^{2+}$  (2),  $\text{Co}^{2+}$  (3), Zn (4).

Аскорбаты Me (II) (1–4) представляют собой плавкие кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде, нерастворимые в спирте.

Разработанный нами способ синтеза аскорбатов марганца, железа, кобальта, цинка является общим, отличается простотой и технологичностью. Целевые продукты получают высокой степени чистоты в виде дигидратов (сушка при комнатной температуре).

Реакция получения комплексонов через Na-соль аскорбиновой кислоты протекает аномально, что показано на примере синтеза аскорбата кобальта (II) (методика 3 б). Для подтверждения структуры полученных соединений (1–4) проведены качественные реакции на Me (II).

Аскорбат марганца (II) при взаимодействии с гидроксидом натрия в водном растворе образует осадок  $Mn(OH)_2$  бледно-розового цвета, который быстро бурет на воздухе. Аскорбат железа (II) с гидроксидом натрия в водном растворе дает осадок  $Fe(OH)_2$  грязно-зеленого цвета, с  $K_3[Fe(CN)_6]$  образует темно-синий осадок  $Fe_3[Fe(CN)_6]_2$  турнбулевой сини.

Аскорбат кобальта (II) при действии водного раствора гидроксида натрия образует осадок  $Co(OH)_2$  ярко синего цвета.

Аскорбат цинка с раствором NaOH дает осадок  $Zn(OH)_2$ , с  $K_3[Fe(CN)_6]$  – желтый осадок  $Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ .

При исследовании реакции взаимодействия аскорбиновой кислоты с ионами  $Cu^{2+}$  показано, что на ряду с комплексообразованием протекают побочные окислительно-восстановительные процессы: окисление аскорбиновой кислоты, которое катализируется ионами  $Cu^{2+}$  и восстановление ионов  $Cu^{2+}$  до  $Cu^{1+}$  с образованием  $Cu_2O$  (осадок красного цвета). Для снижения побочных реакций нами была проведена отработка оптимальных условий реакции комплексообразования. Во всех опытах в качестве реагента использовался гидролизат сульфата меди (II). Изучалось влияние следующих факторов: температура реакции, время, порядок смешивания реагента и субстрата, способ обработки реакционной смеси.

Из данных опытов 5а–5г следует, что наибольший выход аскорбата меди (II) (51 %) получается по методике (5б), температура реакции 30–35 °С, выдержка реакционной смеси 3 часа при комнатной температуре. Аскорбат меди (II) дигидрат кристаллический продукт голубого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. Легко очищается

методом высаживания из водного раствора спиртом. При температуре 132–134 °С наблюдается начало разложения продукта.

Аскорбат меди (II) дает качественную реакцию на ионы  $\text{Cu}^{2+}$ : с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  образуется осадок  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  красно-бурого цвета.

### **Методики синтеза комплексонов аскорбиновой кислоты марганца, железа, кобальта, меди, цинка**

Для синтеза аскорбатов были использованы следующие реактивы: аскорбиновая кислота, имп. «ч», «Экофарм», сульфаты:  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  марки «хч»;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  «ч», ГОСТ 4462-78 ЗАО «Вектон» (Экофарм);  $\text{NaOH}$  –марки «хч».

#### **1. Синтез аскорбата марганца (II)**

Раствор 3,42 г (0,014 моль) сульфата марганца (II),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды (pH 3) нагревают до 45–50 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (pH 2) присыпают порциями 5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты, нагревают реакционную смесь до 45–50 °С 30 минут (pH 1–2). Затем выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Гомогенный раствор упаривают, получают кристаллический продукт светло-розового цвета, который промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 6,0 г (96,70 %) аскорбата марганца (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Mn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аскорбат марганца (II) дигидрат кристаллический продукт светло-розового цвета, хорошо растворяется в воде (водный раствор имеет малиновый цвет), в спирте не растворяется. При температуре 115–116 °С плавится с обугливанием.

#### **2. Синтез аскорбата железа (II)**

Раствор 3,95 г (0,0142 моль) сульфата железа (II)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды (pH 3) нагревают до 40–45 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (pH 2) прибавляют порциями 5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты, нагревают до 45 °С в течение 30 минут (pH 2), а затем выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Гомогенный реакционный раствор зеленоватого цвета упаривают, получают крупные кристаллы светло-зеленого цвета, которые промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 5,9 г (96,60 %) аскорбата железа (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аскорбат железа (II) дигидрат кристаллический продукт светло-зеленого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При температуре 136–137 °С плавится с обугливанием.

### **3. Синтез аскорбата кобальта (II)**

а) Раствор 2,4 (0,0085 моль) сульфата кобальта (II),  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды (рН 3) нагревают до 40–45 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (рН 2) прибавляют по частям 3 г (0,017 моль) аскорбиновой кислоты, нагревают до 45–50 °С 30 минут, а затем выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Гомогенный реакционный раствор розового цвета упаривают, кристаллический продукт розоватого цвета промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 3,7 г (97,30 %) аскорбата кобальта (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Co} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аскорбат кобальта (II) дигидрат кристаллический продукт розового цвета, хорошо растворяется в воде (водный раствор розового цвета), не растворяется в спирте. При температуре 144–145 °С плавится с обугливанием.

б) К раствору 3 г (0,017 моль) аскорбиновой кислоты в 15 мл воды (рН 2) прибавляют 0,68 г (0,017 моль) гидроксида натрия и перемешивают до полного растворения (температура 32 °С, рН 5). К гомогенному раствору прибавляют 2,4 г (0,0085 моль) сульфата кобальта (II),  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , нагревают при 40–45 °С в течение 30 минут и выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Гомогенный раствор красноватого цвета упаривают, получают кристаллический продукт розового цвета с бурым оттенком, который промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают кристаллический продукт в количестве 3,5 г, который хорошо растворяется в воде (водный раствор желтоватого цвета), не растворяется в этаноле. При температуре 180 °С наблюдается начало разложения, а при температуре выше 200 °С происходит образование обильного зольного серо-черного осадка.

### **4. Синтез аскорбата цинка.**

Раствор 4,07 г (0,0142 моль) сульфата цинка,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды (рН 3) нагревают до 45–50 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (рН 2) присыпают порциями 5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты, перемешивают до полного растворения, нагревают реакционную смесь до 45–50 °С 30 минут (рН 1–2) и выдерживают при комнатной температуре 2 часа. Бесцветный гомогенный раствор упаривают, кристаллический продукт промывают этанолом, проводят

качественный контроль на содержание сульфат-анионов (с  $\text{BaCl}_2$ ) и сушат при комнатной температуре. Получают 6,02 г (94,20 %) аскорбата цинка дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аскорбат цинка дигидрат кристаллический продукт белого цвета (кремовый оттенок), хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. При необходимости дополнительная очистка препарата возможна методом высаживания из водного раствора этанолом. При температуре 93–94 °С продукт плавится с обугливанием.

### 5. Синтез аскорбата меди (II).

а) Раствор 3,4 (0,0142 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды (рН 3) нагревают до 40–45 °С в течение 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (рН 2) присыпают по частям 5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты, перемешивают до полного растворения, нагревают при 40–45 °С 30 минут (рН 1–2) и выдерживают при комнатной температуре в течение 2–3 часов. При этом реакционная масса приобретает светло-зеленый цвет и на дне колбы осаждается незначительное количество осадка красного цвета  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Реакционную смесь фильтруют, гомогенный раствор упаривают и получают кристаллический продукт голубого цвета с примесью зеленой густой жидкости. Сырец промывают несколько раз этанолом, голубые кристаллы сушат на воздухе. Получают 2,9 г (46,50 %) аскорбата меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аскорбат меди (II) дигидрат кристаллический продукт голубого цвета, хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте. Легко очищается методом высаживания из водного раствора спиртом. При температуре 132–134 °С наблюдается начало разложения.

б) Раствору 3,4 г (0,0142 моль) сульфата меди (II),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 15 мл воды (рН 3) нагревают при 40–45 °С 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата (рН 2) присыпают порциями 5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты при температуре 30–35 °С, перемешивают до полного растворения и выдерживают в течение 3-х часов при комнатной температуре. Реакционная смесь приобретает светло-зеленый цвет и на дне колбы осаждается незначительное количество  $\text{Cu}_2\text{O}$  красного цвета. Реакционную смесь фильтруют, гомогенный раствор упаривают, остаток обрабатывают и очищают этанолом по аналогии с методикой (5а). Получают 3,27 г (51,0 %) аскорбата меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

в) Раствор 1,7 г (0,0142 моль) сульфата меди (II) в 10 мл воды нагревают до 40–45 °С 20 минут. К гомогенному раствору гидролизата присыпают 2,5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты при температуре 30–35 °С, перемешивают до полного растворения и выдерживают при комнатной температуре 45–50 минут. Реакционный раствор фильтруют от микропримесей  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Фильтрат (светло-зеленого цвета) высаживают этанолом, голубые кристаллы фильтруют, промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 0,7 г (22,0 %) аскорбата меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

г) К гомогенному раствору 2,5 г (0,0284 моль) аскорбиновой кислоты (рН 2) приливают гидролизат, полученный из 1,7 г (0,0142 моль)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 10 мл воды при температуре 40–45 °С в течение 20 минут. Реакционную смесь выдерживают 45–50 минут при комнатной температуре, фильтруют от микропримесей  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Фильтрат (светло-зеленого цвета) высаживают этанолом, голубые кристаллы фильтруют, промывают этанолом и сушат при комнатной температуре. Получают 0,82 г (25,0 %) аскорбата меди (II) дигидрата,  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6]_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аскорбат меди (II), полученный по методикам (5б–5г), хорошо растворяется в воде, не растворяется в спирте, имеет температуру начала разложения 132–134 °С, с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  дает качественную реакцию на ионы  $\text{Cu}^{2+}$  – выпадает осадок  $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  красно-бурого цвета.

Данные анализов комплексных солей аскорбиновой кислоты двухвалентных 3d-металлов приведены в табл. 7.

В результате экспериментальных исследований изучена реакция комплексообразования аскорбиновой кислоты с ионами двухвалентных 3d-металлов. Разработан технологичный общий способ получения биологически активных комплексных соединений: аскорбатов марганца (II), железа (II), кобальта (II), меди (II) и цинка. Показано, что для обеспечения стабильности аскорбиновой кислоты реакцию необходимо проводить в кислой среде. Найдены оптимальные условия синтеза, обеспечивающие стабильность аскорбиновой кислоты и реагентов (гидроксидов Me (II)), что позволяет получать химически чистые целевые продукты с высокими выходами.

Таблица 7

## Данные анализов комплексных солей аскорбиновой кислоты двухвалентных 3d-металлов

№ соединения	Брутто формула	Название соединения	Выход %	Цвет	Т.пл. °С	Растворимость в H <sub>2</sub> O	Качественные реакции
1	[C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Mn · 2H <sub>2</sub> O	Аскорбат марганца (II) дигидрат	96,70	светло-розовый	115–116 (с. разл.)	х.р.	Mn <sup>2+</sup> (NaOH)
2	[C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Fe · 2H <sub>2</sub> O	Аскорбат железа (II) дигидрат	96,60	светло-зеленый	136–137 (с. разл.)	х.р.	Fe <sup>2+</sup> (NaOH, K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])
3	[C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Co · 2H <sub>2</sub> O	Аскорбат кобальта (II) дигидрат	97,30	розоватый	144–145 (с. разл.)	х.р.	Co <sup>2+</sup> (NaOH)
4	[C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Zn · 2H <sub>2</sub> O	Аскорбат цинка дигидрат	94,20	белый	93–94 (с. разл.)	х.р.	Zn <sup>2+</sup> (NaOH, K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])
5	[C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> Cu · 2H <sub>2</sub> O	Аскорбат меди (II) дигидрат	51,00	голубой	132–134 (с. разл.)	х.р.	Cu <sup>2+</sup> (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])

Сокращения: с. разл. – с разложением; х.р. – хорошо растворяется



## ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРАЛЬНЫХ И КИСЛЫХ $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ С ИОНАМИ ДВУХВАЛЕНТНЫХ 3D-МЕТАЛЛОВ

При изучении реакции взаимодействия  $\alpha$ -аминокислот с ионами двухвалентных 3d-металлов нами выявлено, что комплексообразующая способность нейтральных и кислых  $\alpha$ -аминокислот зависит от ряда факторов.

### 6.1. Факторы, влияющие на процесс комплексообразования

6.1.1. Кислотно-основные свойства нейтральных и кислых  $\alpha$ -аминокислот. pH реакционной среды.

6.1.2. Гомогенность реакционного раствора: растворимость субстрата в воде; растворимость реагентов в кислой и щелочной средах и их устойчивость к окислению.

6.1.3. Время реакции и температурные режимы.

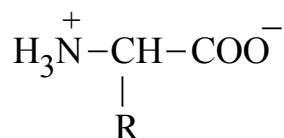
Сравнительная комплексообразующая способность исследовалась на примере следующих субстратов ( $\alpha$ -аминокислот): нейтральных (глицин, 4-гидроксипролин), кислых (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); реагентов – сульфатов металлов: Mn (II), Fe (II), Cu (II), Zn (II).

#### 6.1.1. Кислотно-основные свойства $\alpha$ -аминокислот. pH-реакционной среды

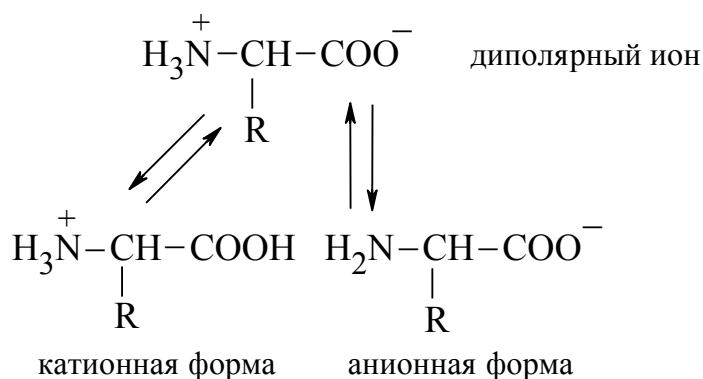
$\alpha$ -Аминокислоты проявляют кислотно-основные (амфотерные) свойства. Амфотерность аминокислот обусловлена кислотными (COOH) и основными (NH<sub>2</sub>) функциональными группами в их молекулах.

Кислотно-основные свойства аминокислот определяют многие физико-химические и биологические свойства белков. На этих свойствах основаны почти все методы выделения и идентификации аминокислот и белков.

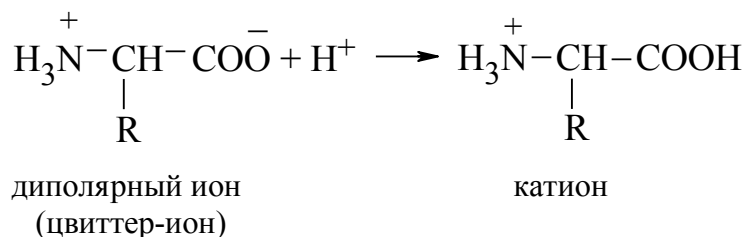
В кристаллическом состоянии  $\alpha$ -аминокислоты существуют как дипольные ионы:



В водном растворе аминокислоты находятся в виде равновесной смеси: диполярного иона, катионной и анионной форм:

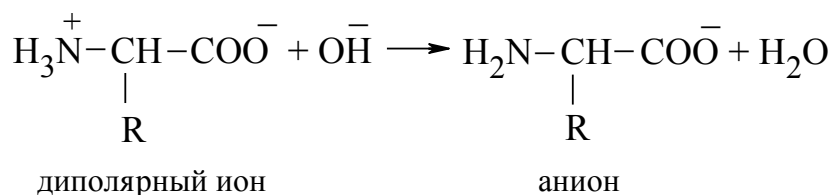


Положение равновесия зависит от pH реакционной среды. Изменение pH среды от кислой до щелочной влияет на заряд растворенных аминокислот. В сильно кислых средах (pH 1–2) все аминокислоты несут положительный заряд, преобладает катионная форма, так как избыток протонов в среде подавляет диссоциацию карбоксильной группы.



Полностью протонированная аминокислота (катионная форма) с позиций теории Брёнстеда является двухосновной кислотой, содержащей две кислотные группы, недиссоциированную карбоксильную группу и протонированную аминогруппу с соответствующими значениями  $\text{pK}_{\text{a}1}$ ,  $\text{pK}_{\text{a}2}$ .

В сильно щелочных средах ( $\text{pH} > 11$ ), где имеется избыток ионов  $\text{OH}^-$ , аминокислоты находятся в виде отрицательно заряженных ионов (анионов), так как диссоциирует  $\text{NH}_3$ -группа.



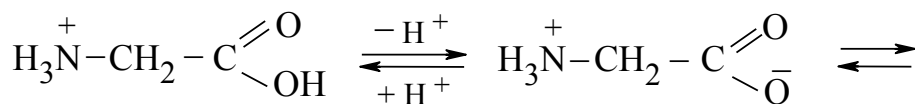
Депротонирование диполярного иона приводит к получению анионной формы аминокислоты – карбоксилат-иона, являющегося основанием Брэнстеда. Значения, характеризующие кислотные свойства карбоксильной группы аминокислоты, обычно лежат в интервале  $pK_{a1}$  1–3. Значения  $pK_{a2}$ , характеризующие кислотность аминогруппы, лежат в интервале от 9 до 10.

Положение равновесия в водном растворе аминокислот при определенных значениях pH существенно зависит от строения радикала, от присутствия в нем ионогенных групп, играющих дополнительную роль кислотных и основных центров.

В зависимости от pH среды аминокислоты имеют суммарный нулевой, положительный и отрицательный заряд. Состояние, в котором заряд аминокислоты равен нулю, называется изоэлектрической точкой (pI). Изоэлектрическая точка очень точно отражает кислотно-основные свойства разных групп в аминокислотах и является одной из важнейших констант, характеризующих аминокислоту. Изоэлектрическая точка для неполярных (гидрофобных) аминокислот приближается к нейтральным значениям pH (5,5–6,3) вследствие большей способности к ионизации карбоксильной группы под влиянием (– I) –эффекта  $NH_2$ -группы.

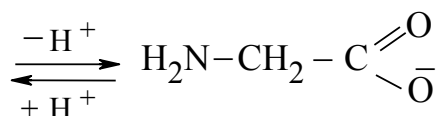
Кислые  $\alpha$ -аминокислоты имеют в радикале дополнительную карбоксильную группу и в сильно кислой среде находятся в полностью протонированной форме. Кислые  $\alpha$ -аминокислоты являются трехосновными. У кислых  $\alpha$ -аминокислот изоэлектрическая точка находится при  $pH < 7$ .

Кислотно-основное равновесие для нейтральных  $\alpha$ -аминокислот (на примере глицина).



катионная форма  
кислота,  $pK_{a1}$  2,34

цвиттер-ион  
pI 6,0



анионная форма  
основание,  $pK_{a2}$  9,60

Взаимное влияние групп особенно ярко проявляется у  $\alpha$ -аминокислот, где обе группы находятся в непосредственной близости, где их взаимодействие передается через систему сопряженных связей. Благодаря электроноакцепторным свойствам группы  $\text{NH}_3^+$  резко усиливается кислотность карбоксильных групп,  $\text{pK}_{a1}$  глицина 2,34, уксусной кислоты 4,75.

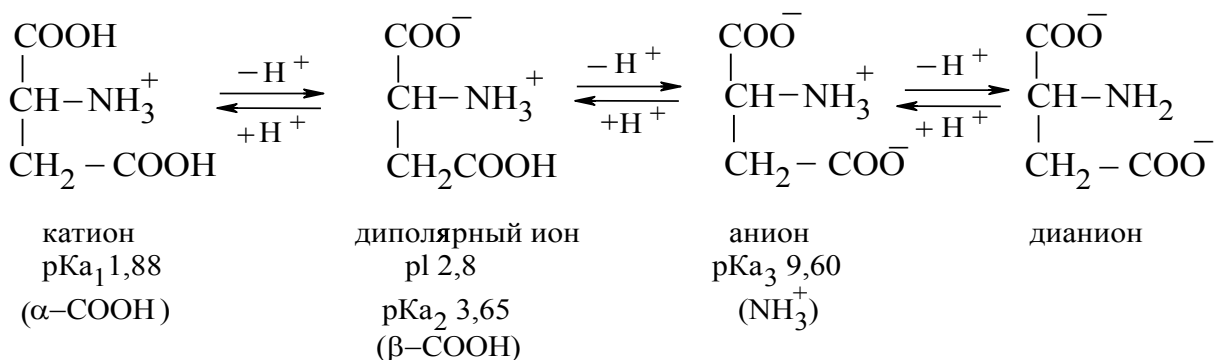
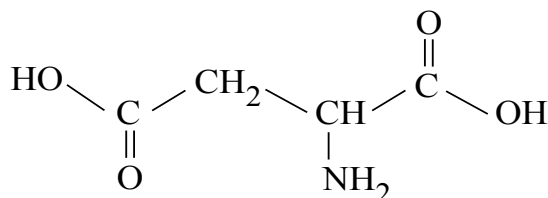
Аминогруппа подвергается взаимокомпенсируемому влиянию электроноакцепторной карбонильной группы и электронодонорного отрицательно заряженного атома кислорода.

В результате основность аминогруппы аминуксусной кислоты мало отличается от основности этиламина ( $\text{pK}_a$  3,33). Аминогруппа аминокислот ионизирована в несколько меньшей степени, чем карбоксильная группа и водный раствор аминокислоты имеет слабосильный характер.

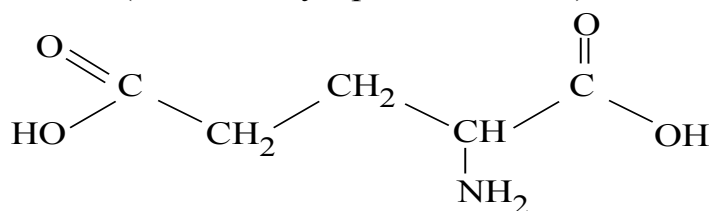
Кислотно-основные свойства 4-гидроксипролина при 25 °C:  $\text{pK}_{a1}$  1,92;  $\text{pK}_{a2}$  9,74; изоэлектрическая точка  $\text{pI}$  5,83.

### Кислотно-основное равновесие для кислых $\alpha$ -аминокислот (на примере аспарагиновой кислоты)

L-Аспарагиновая ( $\alpha$ -аминоянтарная кислота)



L-Глутаминовая ( $\alpha$ -аминоглутаровая кислота)



Кислотно-основные свойства при 25 °С:  $pK_{a1}$  2,19 ( $\alpha$ -COOH);  $pK_{a2}$  4,25 ( $\gamma$ -COOH),  $pK_{a3}$  9,67 ( $NH_3^+$ )

Изоэлектрическая точка при 25 °С –  $pI$  3,22. В организме при физиологических значениях pH аспарагиновая и глутаминовая кислоты находятся в анионной форме, так у них ионизированы обе карбоксильные группы.

### 6.1.2. Гомогенность реакционного раствора

Гомогенность реакционного раствора зависит от растворимости субстрата (аминокислоты) и реагентов в воде, реакционной среде.

Растворимость следующих  $\alpha$ -аминокислот в воде при 25 °С – г /100 мл  $H_2O$ :

Глицин ( $\alpha$ -аминоуксусная) кислота – 25,0

4-гидроксипролин – 36,1

Аспарагиновая ( $\alpha$ -аминоянтарная) кислота – 0,5

Глутаминовая ( $\alpha$ -аминоглутаровая) кислота – 0,89.

### Растворимость реагентов

(гидроксидов, сульфатов двухвалентных 3d-металлов)

Таблица 8

Реагенты	Растворимость в воде г / 100 г	ПР 25 °С	Растворимость в других растворителях
1	2	3	4
$Mn(OH)_2$	$2 \cdot 10^{-4}$ (18 °С)	$1,9 \cdot 10^{-13}$	Р. в солях аммония Н. р. в щелочах Реаг. с кислотами
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	х. р.	–	–
$Fe(OH)_2$	$4,5 \cdot 10^{-4}$ (18 °С)	$8,0 \cdot 10^{-16}$	Р. в $NH_4Cl$ Н. р. в щелочах Реаг. с кислотами
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	33 (0 °С) 149 (50 °С)	–	Н. р. в спирте
$Co(OH)_2$	н. р.	$1,6 \cdot 10^{-15}$	Р. в солях аммония Н. р. в щелочах Реаг. с кислотами
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	87 (20 °С) 101,4 (100 °С)	–	. в спирте 25 (3 °С)

1	2	3	4
$\text{Cu}(\text{OH})_2$	н.р. (холодная вода) реаг. (горячая вода)	$2,2 \cdot 10^{-20}$	Реаг. с кислотами $\text{NH}_4\text{OH}$ , $\text{KCN}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	35,6 (20 °C) 205 (100 °C)	–	Н. р. в спирте Р. в метаноле
$\text{Zn}(\text{OH})_2$	сл. р.	$1,2 \cdot 10^{-17}$	Реаг. с кислотами, щелочами
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	165 (20 °C) 202 (100 °C))	–	н. р. в щелочах сл. р. в спирте

*Сокращения:* р. – растворяется; н. р. – не растворяется; х. р. – хорошо растворяется; сл. р. – слабо растворяется; реаг. – реагирует [63].

### 6.1.3. Фактор-время реакции и температурные режимы

Из данных экспериментальных исследований комплексообразующей способности нейтральных и кислых  $\alpha$ -аминокислот выявлены оптимальные температурные режимы и время реакции.

Показано, что для нейтральных и кислых  $\alpha$ -аминокислот значения оптимальных режимов реакции близкие и в среднем составляют: время реакции 35–45 минут, температура реакции 45–55 °C.

### 6.2. Комплексообразующая способность нейтральных $\alpha$ -аминокислот (глицина, 4-гидроксипролина) с ионами $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$

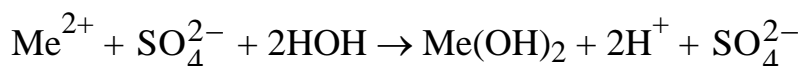
При проведении экспериментальных исследований установлено, что комплексные соли глицина, 4-гидроксипролина марганца (II), железа (II) получаются с высокими выходами ( $\approx 90\%$ ) в кислой среде (pH 2–3) при действии субстратов на гидролизаты соответствующих сульфатов (разделы 1.3; 3.3).

В результате гидролиза сульфатов образуются гидроксиды:  $\text{Mn}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ , которые хорошо растворяются в кислой среде и не подвергаются окислению.

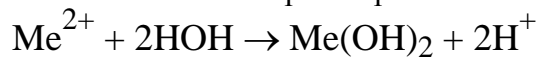
Субстраты также хорошо растворяются в воде и процесс образования комплексных солей протекает в гомогенной фазе.

Схема комплексообразования (на примере глицина) с ионами  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  (при pH 2–3).

I-Стадия. Гидролиз сульфатов Mn (II), Fe(II). (pH 2–3)

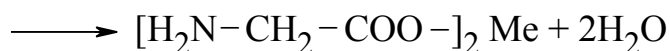
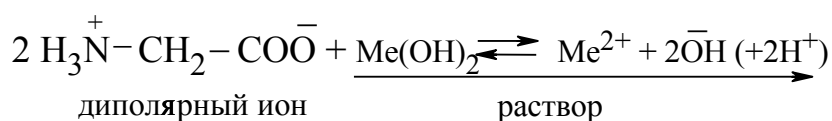


в растворе



в растворе

II-Стадия. Комплексообразование



где  $\text{Me} = \text{Mn}^{2+}, \text{Fe}^{2+}$ .

В щелочной среде (pH 9) комплексообразование глицина и 4-гидроксипролина с ионами  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  протекает в гетерогенной фазе. Сущность метода в щелочной среде заключается в действии на гомогенную реакционную смесь  $\alpha$ -аминокислот и гидроксида натрия сульфатами металлов (присыпание кристаллических реагентов). В данных условиях происходит выпадение из реакционной смеси трудно-растворимых гидроксидов ( $\text{Mn}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ).

Субстраты (глицин, 4-гидроксипролин) являются нейтральными  $\alpha$ -аминокислотами и имеют значения изоэлектрической точки (pI) 6,0; 5,83

В этом случае конкурирующая реакция – образование трудно-растворимых гидроксидов при взаимодействии сульфатов с NaOH, что затрудняет выделение целевых продуктов.

Определяющим фактором комплексообразующей способности нейтральных  $\alpha$ -аминокислот с ионами  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  является проведение реакции в кислой среде (pH 2–3). Кислая среда обуславливает гомогенность реакционного раствора, так как образующие в результате гидролиза сульфатов гидроксиды ( $\text{Mn}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ) хорошо растворяются в кислой среде и не подвергаются окислению.

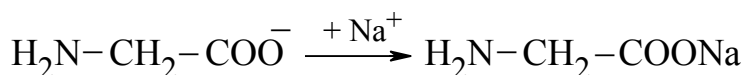
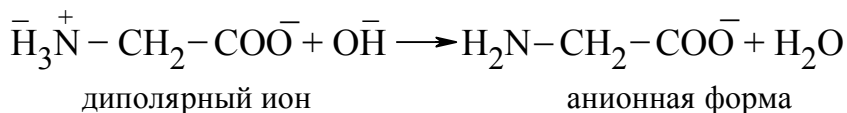
Реакция комплексообразования глицина и 4-гидроксипролина с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  однозначно протекает в щелочной гомогенной среде (pH 10) с высокими выходами целевых продуктов (разделы 1.3; 3.3).

Сущность метода заключается в действии на гомогенную реакционную смесь  $\alpha$ -аминокислот и гидроксида натрия сульфатами Cu (II), Zn (II) (прибавление кристаллических реагентов).

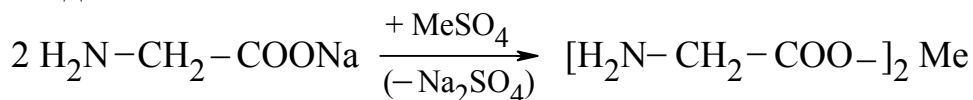
В щелочной среде при избытке  $\text{OH}^-$ -ионов субстраты ( $\alpha$ -аминокислоты) находятся в виде анионов. Депротонирование диполярного иона приводит к получению анионной формы аминокислоты-карбоксилат иона.

При взаимодействии сульфатов с NaOH в реакционной смеси образуются гидроксиды  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ , которые в условиях реакции не выпадают в виде осадков, находятся в растворе.  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  в щелочной среде и при нагревании образует растворимый куприт,  $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{OH})_4]$ ;  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  амфотерный гидроксид, в щелочной среде образует растворимый цинкат,  $\text{Na}_2\text{ZnO}_2$ . Скорость комплексообразования аниона  $\alpha$ -аминокислоты с катионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  в гомогенной фазе значительно выше, чем скорость образования (выпадения) труднорастворимых  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ .

Схема комплексообразования (на примере глицина) с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (при pH 10).



II Стадия.



где  $\text{Me} = \text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ .

Определяющим фактором комплексообразующей способности нейтральных  $\alpha$ -аминокислот с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  в щелочной среде является образование активной анионной формы (карбоксилат-ионов) субстратов, устойчивость и растворимость в щелочной среде гидроксидов  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ . Перечисленные факторы обуславливают гомогенность реакционной среды и высокие выходы целевых продуктов.



### 6.3. Комплексообразующая способность кислых $\alpha$ -аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) с ионами $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$

При изучении реакции комплексообразования аспарагиновой и глутаминовой кислот с ионами двухвалентных 3d-металлов нами было показано, что комплексоны с высокими выходами получаются в гомогенной щелочной среде (pH 11–12) [3].

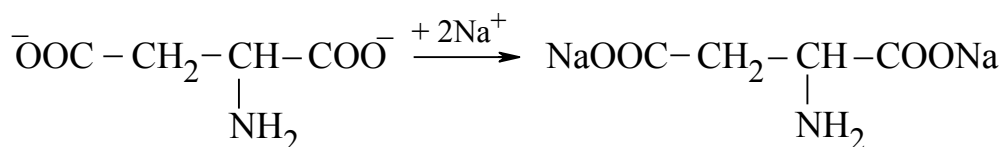
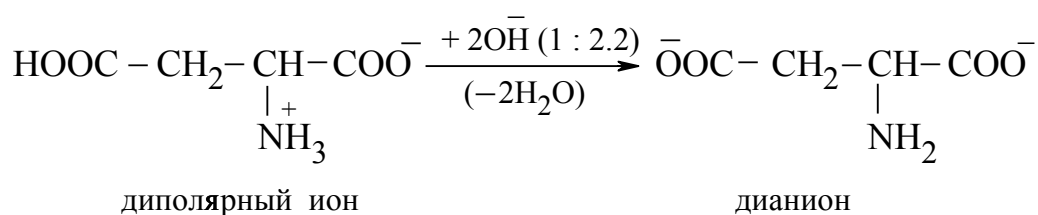
Сущность способа заключается в следующем. Первоначально действуют на суспензию малорастворимых субстратов (аспарагиновой и глутаминовой кислот) в воде гидроксидом натрия в соотношении 1 : 2,2 (в молях). Затем к гомогенному щелочному реакционному раствору (pH 11–12) прибавляют кристаллические сульфаты.

Аспарагиновая, глутаминовая кислоты относятся к кислым  $\alpha$ -аминокислотам (pI 2,8; 3,22). Кислые аминокислоты имеют в радикале дополнительную карбоксильную группу. В сильно кислой среде (pH 1–2) они находятся в полностью протонированной форме, в сильно щелочной среде (pH 11–12) – в виде дианиона.

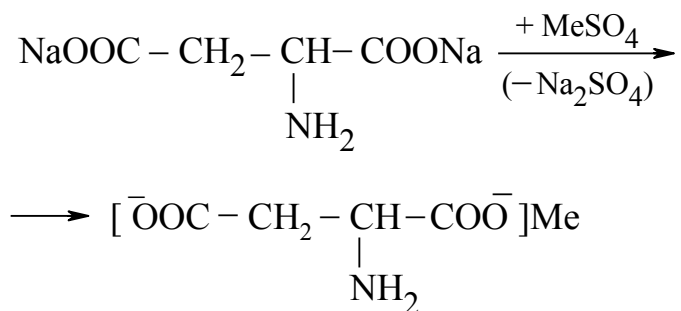
В сильно щелочной среде кислые  $\alpha$ -аминокислоты в активной дианионной форме вступают в реакцию комплексообразования через динатриевые соли. При действии на реакционную смесь сульфатами металлов (II) (присыпание кристаллических реагентов) протекает замещение натрия на ионы металлов с образованием комплексонов.

Схема реакции (на примере аспарагиновой кислоты)

I Стадия.  $NaOH \rightleftharpoons Na^+ + OH^-$



II Стадия.



где  $\text{Me}^{2+} = \text{Mn}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$ .

Определяющим фактором комплексообразующей способности кислых  $\alpha$ -аминокислот с ионами двухвалентных  $3d$ -металлов в щелочной среде (pH 11–12) является растворимость субстрата в результате превращения в активный карбоксилат-дианион и образование динатриевой соли. А также введение в реакционную смесь кристаллических реагентов (сульфатов  $\text{Me}(\text{II})$ ) с целью исключения их гидролиза в водной среде и образования трудно растворимых гидроксидов. Перечисленные факторы обуславливают гомогенность реакционной среды, однозначность реакции замещения натрия на ионы  $\text{Me}^{2+}$  и получение с высокими выходами целевых продуктов.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Кадырова Р.Г. Янтарная кислота и ее свойства / Р.Г. Кадырова, Г.Ф. Кабиров, Б.М. Гильметдинов. – Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2005. – 100 с.
2. Кабиров Г.Ф. Химия и биогенные свойства 3d-элементов (Mn–Zn) и их комплексонатов / Г.Ф. Кабиров, Р.Г. Кадырова, Б.М. Гильметдинов. – Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2006. – 112 с.
3. Кадырова Р.Г. Биологические свойства и синтез комплексных солей  $\alpha$ -аминокислот биогенных металлов / Р.Г. Кадырова, Г.Ф. Кабиров, Р.Р. Муллахметов. – Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2014. – 108 с.
4. Кабиров Г.Ф. Разработка средств профилактики и лечения гипомикроэлементозов овец и свиней: дис. ... докт. вет. наук. – Казань, 2000. – 317 с.
5. Кабиров Г.Ф. Хелатные формы биогенных металлов в животноводстве / Г.Ф. Кабиров, Г.П. Логинов, Н.З. Хазипов. – Казань: ФГОУ ВПО КГАВМ, 2004. – 284 с.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. Т. 2. – М.: Новая волна, 2000. – С. 441.
7. Белобородов В.Л. Органическая химия / В.Л. Белобородов, С.Э. Зурабян, А.П. Лузин, Н.А. Тюкавкина. – М.: Дрофа, 2004. – 599 с.
8. Глицин // Википедия [Электронный ресурс]. URL: <https://ru.wikipedia.org> (дата обращения 13.04.2016).
9. Орлов Р.С. Нормальная физиология / Р.С. Орлов, А.Д. Ноздрачев. – М: ГЭО ТАР-Медиа, 2009–688 с.
10. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. Т. 1. – М.: Новая волна, 2000. С. 122–126.
11. Пат. 2367427 РФ. Литийсодержащее средство для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний и способ применения данного средства / О.А. Громов., И.Ю. Торшин, А.А. Никонова, И.В. Гоголева. Оpubл. 20.09.2009.
12. Лукачева В.А. Влияние глицината лития на адаптационные процессы при моделированном стрессе у сельскохозяйственных птиц // Аграрный вестник Урала. 2009. Вып. 5 (59).
13. Пат. 216889 РФ. Средство для лечения сердечно-сосудистых заболеваний / И.Ф. Макаревич, Л.Г. Алмакаева, Е.И. Затула и др. Оpubл. 20.06.2001.

14. Лунева С.Н., Накоскин А.М., Ваганова Л.А. Метаболизм костной ткани крыс при пероральном введении аминокислотных комплексов кальция // Зауральский научный вестник. 2012. Вып. 2.

15. Накоскин А.Н., Воронцов Б.С., Лунева С.Н. и др. Квантово-химическое моделирование аминокислотных комплексов кальция и оценка возможности их применения для восполнения дефицита кальция // Современ. проблемы науки и образования. Вып. 3/2012. Курган. Россия. ФГБОУ ВПО Курганский гос. ун-т.

16. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Синтез солей лития  $\alpha$ -аминокислот // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2013, – Т. 215. – С. 141–147.

17. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Синтез магниевых и кальциевых солей  $\alpha$ -аминокислот // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2013. – Т. 216. – С. 157–164.

18. Крижановская О.П. Гигиеническая оценка и обоснование использования глицината марганца при выращивании цыплят-бройлеров: Автореф. дис. ...канд. вет. наук. Национальный аграрный университет. – Киев, 2007.

19. Балышев А.В. Разработка и изучение биологической активности фармацевтической композиции на основе соли цинка (II) и глицина: Автореф. Дис. ...канд. биол. наук. – М., 2005.

20. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Разработка рационального способа получения комплексных солей марганца, железа с глицином и метионином // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2013. – Т. 216. – С. 150–157.

21. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Синтез медных и цинковых солей метионина и глицина. // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2013. – Т. 213. – С. 109–115.

22. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Исследование реакции комплексообразования  $\alpha$ -аминокислот с кобальтом (II) // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2014. – Т. 220. – С. 118–123.

23. Пат. 2174508. РФ. Способ получения сукцинатов *d*-металлов / Р.Г. Кадырова, К.Х. Папуниди, Б.М. Гильметдинов. Опубл. 10.10.2001.

24. Свойства вещества: глицилглицин // Химия и токсикология [Электронный ресурс]. URL: chemister.ru (дата обращения 22.04.2016).

25. Комов В.П. Биохимия / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004.
26. Щипаева Е.В. Иммунофармакологические свойства глицин- и пролинсодержащих дипептидов: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Москва: ГУНИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 2008.
27. Гудашева Т.А. Стратегия создания дипептидных лекарств // Инновации в современной фармакологии: тез. докл. IV съезда фармакологов России, – Казань, 09/2012.
28. Ложкин С.Н., Тиканадзе А.Д., Тюрюмина М.А. Глутамин и его роль в интенсивной терапии // Вестник интенсивной терапии. 2003. – № 4. Клиническое питание. (Наука и фитнес РФ > glutamine. html).
29. Салтанов А.И., Снеговой А.В. Применение фармаконутриентов в онкологической практике // Вестник Московского онкологического общества. 2009. № 5 (558).
30. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Изучение реакции, взаимодействия глицилглицина с гидроксидами щелочных и щелочноземельных металлов // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2014. – Т. 218. – С. 110–117.
31. Грандберг И.И. Практические работы и семинарские занятия по органической химии / И.И. Грандберг. – М.: Дрофа, 2001. – 352 с.
32. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Изучение комплексообразующей способности глицилглицина с 3*d*-биогенными металлами // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2013. – Т. 218. – С. 102–110.
33. Дробилова О.М. Термодинамические характеристики координационных равновесий β-аланина, L-серина, D, L-α-аланина, глицилглицина и глициласпаргина с ионами 3*d*-переходных металлов (II), в водном растворе: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Иваново: ГХТУ, 2011.
34. Циптович И.К. Курс аналитической химии / И.К.Цитович. – М.: Высш. шк., 1985. – 400 с.
35. Строение и свойства аминокислот, входящих в состав белков. Пептидные связи, соединяющие аминокислоты в цепи // Биохимия: учебник для вузов / Под ред. Е.С. Северянина. М., 2003 [Электронный ресурс]. URL: [biochemistry.ru / biochimija-severina / B 5873 Content. Htme](http://biochemistry.ru/biochimija-severina/B5873Content.htm) (дата обращения 22.04.2016).

36. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Изучение кетонольной таутомерии пептидной связи глицилглицина при комплексообразовании с ионами металлов // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2015. – Т. 221 (1). – С. 90–97.
37. Кнорре Д.Г. Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высш. шк., 2003. – С. 30–34.
38. Тюкавкина Н.А. Биорганическая химия / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков. – М.: Дрофа, 2007. – С. 322–324.
39. Пат. 11422 ВV. Беларусь. Способ получения *N*-ацетил-4-гидроксид-*L*-пролина / З.И. Куваева, Д.В. Лопатик, Т.А. Николаева. Химико-фармацевтический журнал, 2010. Т. 44, № 6, с. 22–23. Оpubл. 12.30.2008.
40. Пат. США 5827874, 27.10.1998 / Meyer Hans.
41. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Разработка способа получения комплексных солей кальция и марганца (II) с 4-гидроксипролином // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2015. – Т. 223 (3). – С. 82–87.
42. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Синтез комплексных солей 4-гидрооксипролина щелочных и щелочноземельных металлов // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2016. – Т. 225 (1). – С. 116–120.
43. Пат. 237081 РФ., Композиция, обладающая иммуностимулирующей и антиоксидантной активностью / Е.Ю. Плотников, В.М. Плотников. Оpubл. 10.11.2009, корпоративный портал ТПУ.
44. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Исследование реакции комплексообразования 4-гидроксипролина с ионами двухвалентных 3d-металлов // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2016. – Т. 225 (1). – С. 125–130.
45. Гамма-аминомасляная кислота // Википедия [Электронный ресурс]. URL: <https://ru.wikipedia.org>. (дата обращения 25.04.2016).
46. Пат. 2181717 РФ. 27.04.2002. Ноотропное средство и способ его получения. / ООО «Консорциум-ПИК». Оpubл. 27.04.2002.
47. Пат. 2242458 РФ. Способ получения кальциевой соли *D*-гомопантотеновой кислоты // Г.Ф. Жданов, Р.Р. Насыбуллин, И.Х. Исмагилов. Оpubл. 20.12.2004.
48. Остренко К.С. Влияние литиевых солей оксиглицина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты на стрессоустойчивость, неспецифическую резистентность и продуктивность лабораторных животных и откармливаемых бычков: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Боровск, 2009.

49. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Разработка рационального способа получения солей  $\gamma$ -аминомасляной кислоты щелочных и щелочноземельных металлов // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2015. – Т. 224(4) – С. 90–94.

50. Денисова О.Ф., Слесарева Е.В., Алимова Р.И. и др. Влияние медного хелата на количественное распределение железа и меди в органах и тканях при постгеморрагической анемии у белых крыс // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1.

51. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Изучение реакции комплексообразования  $\gamma$ -аминомасляной кислоты с ионами двухвалентных 3d-металлов // Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2016, – Т. 225(1) – С. 120–125.

52. Панина Н.В. Минеральный обмен и формирование костной ткани у цыплят-бройлеров при скормливании марганца аскорбата: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Курск: СХА, 2006.

53. Пат. 2105498 РФ. Кормовая добавка для сельскохозяйственных животных и птицы. / А.Ф. Понамарев, И.А. Бойко, О.В. Мерзленко и др. Оpubл. 27.02.1998.

54. Прыгунов В.И. Фармако-токсикологические свойства и применение железа аскорбината в птицеводстве: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – М., 2010.

55. Пат. 2095995 РФ. Способ кормления сельскохозяйственных животных и птицы. / О.В. Мерзленко, А.Ю. Зинкевич, И.А. Бойко и др. Оpubл. 20.11.1997.

56. Пат. 2099965 РФ. Способ кормления сельскохозяйственных животных и птицы / А.Ф. Понаморев, О.В. Мерзленко, А.Ю. Зинкевич и др. Оpubл. 27.12.1997.

57. Козубова Л., Симонов Г., Науменко П. Роль кобальта аскорбината в организме цыплят-бройлеров / Птицеводство. 2014. № 2.

58. Пат. 2078519 РФ. Кормовая добавка. / А.Ю. Зинкевич, А.И. Бойко, О.В. Мерзленко, А.А. Шапошников. Оpubл. 10.05.1997.

59. Пат. 2024514 РФ. Комплекс 1-этилимидазола с аскорбатом цинка / А.И. Скушникова, Е.С. Домнина, М.Г. Воронков и др. Оpubл. 15.12.1994.

60. Мерзленко О.В. Фармакологические свойства препаратов, получаемых на основе биokoординационных соединений металлов с аскорбиновой кислотой: Автореф. дис. ...д-ра. Вет. наук, г. Троицк, 1998.

61. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Разработка способа получения комплексонатов аскорбиновой кислоты двухвалентных 3*d*-металлов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2015. – Т. 221. – С. 97–102.

62. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. Изучение реакции комплексообразования аскорбиновой кислоты с ионами цинка и меди (II) // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2015. – Т. 222(2) – С. 118–123.

63. Справочник химика. – Л: Химия, 1964. – Т. 2.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	3
Глава 1. Синтез и биологические свойства комплексных солей глицина	6
1.1. Физико-химические и биологические свойства глицина .....	6
1.2. Синтез комплексных солей глицина щелочных и щелочно-земельных металлов (лития, магния, кальция) и их свойства .....	7
1.3. Синтез комплексных солей глицина двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства .....	11
Глава 2. Синтез и биологические свойства комплексных солей глицилглицина .....	20
2.1. Физико-химические и биологические свойства глицилглицина	20
2.2. Синтез комплексных солей глицилглицина щелочных и щелочно-земельных металлов (лития, натрия, магния, кальция) и их свойства .....	23
2.3. Синтез комплексных солей глицилглицина двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства ...	30
2.4. Изучение кето-енольной таутомерии пептидной связи глицилглицина при комплексообразовании с ионами металлов .....	39
Глава 3. Синтез и биологические свойства комплексных солей 4-гидроксипролина .....	46
3.1. Физико-химические и биологические свойства 4-гидроксипролина .....	46
3.2. Синтез комплексных солей 4-гидроксипролина щелочных и щелочно-земельных металлов (лития, натрия, магния, кальция) и их свойства .....	48
3.3. Синтез комплексных солей 4-гидроксипролина двухвалентных 3d-металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства ...	56
Глава 4. Синтез и биологические свойства комплексных солей $\gamma$ -аминомасляной кислоты .....	67
4.1. Физико-химические и биологические свойства $\gamma$ -аминомасляной кислоты .....	67
4.2. Синтез комплексных солей $\gamma$ -аминомасляной кислоты щелочных и щелочно-земельных металлов (лития, магния, кальция) и их свойства .....	70
4.3. Синтез комплексных солей $\gamma$ -аминомасляной кислоты двухвалентных 3d-металлов (марганца, меди, цинка) и их свойства .....	76

Глава 5. Синтез и биологические свойства комплексных солей аскорбиновой кислоты .....	84
5.1. Физико-химические и биологические свойства аскорбиновой кислоты .....	84
5.2. Синтез комплексных солей аскорбиновой кислоты двухвалентных 3 <i>d</i> -металлов (марганца, железа, кобальта, меди, цинка) и их свойства .....	86
Глава 6. Сравнительная характеристика комплексообразующей способности нейтральных и кислых α-аминокислот с ионами двухвалентных 3 <i>d</i> -металлов .....	97
6.1. Факторы, влияющие на процесс комплексообразования .....	97
6.2. Комплексообразующая способность нейтральных α-аминокислот (глицина, 4-гидроксипролина) с ионами $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ .....	102
6.3. Комплексообразующая способность кислых α-аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) с ионами $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ .....	105
Библиографический список .....	107

*Научное издание*

**Кадырова Раиса Григорьевна,  
Кабиров Галимзян Фазылзянович,  
Муллахметов Рустем Ренатович**

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ  
БИОГЕННЫХ КИСЛОТ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ**

Монография

Кафедра химии КГЭУ

Авторская редакция  
Компьютерная верстка *Т.И. Лунченкова*

Подписано в печать 23.05.16.

Формат 60 х 84/16. Бумага «Business». Гарнитура «Times».

Вид печати РОМ. Усл. печ.л. 6,85. Уч.-изд. л. 7,61. Тираж 500 экз. Заказ 4994

Редакционно-издательский отдел КГЭУ,  
420066, Казань, Красносельская, 51

