



УДК 577.112.3.087:616.858-008.6

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БОРАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОРА, ДОФАМИНА И ИХ ЛИПОСОМНЫХ ФОРМ

© 1998 г. Н. В. Борисова, В. И. Крюков*, А. П. Каплун#, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 14.07.97 г. Принята к печати 15.04.98 г.

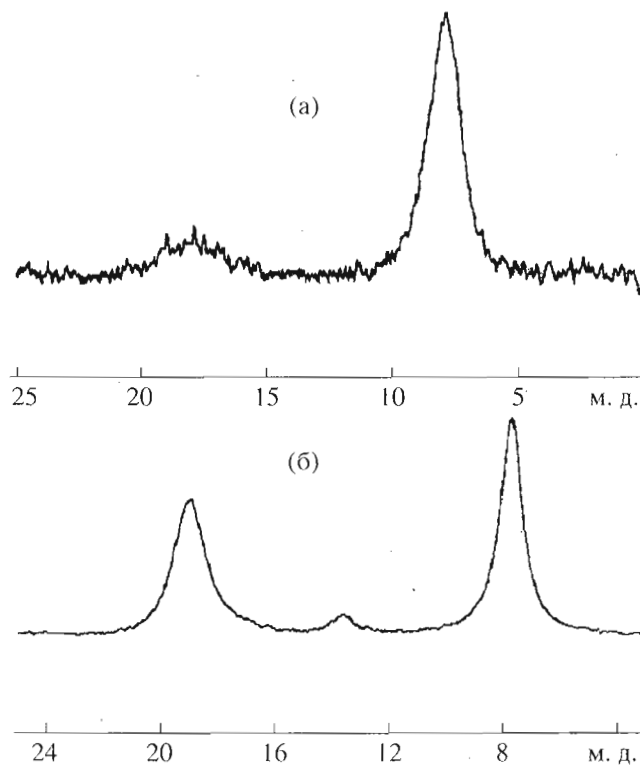
Для увеличения растворимости включаемых в липосомы L-3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA) и дофамина (DA) было предложено превращать их в боратные комплексы аммония и 1-адамантиламмония. Исследована структура полученных моно-DOPA-, DA-боратов аммония и 1-адамантиламмония с помощью ЯМР на ядрах ^{11}B и ^1H , а также ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии и кондуктометрии. Липосомная форма комплексов характеризуется высоким соотношением активное вещество/липид (0.5 моль/моль), катехины в виде комплексных солей лучше удерживаются во внутрилипосомном объеме.

Ключевые слова: яичный фосфатидилхолин; DOPA; дофамин; липосомы; боратные комплексы; 1-аминоадамантан; Паркинсона болезнь.

Впервые пирокатехинбораты были получены в 1917 г. [1]. Несмотря на столь значительный промежуток времени, отделяющий нас от первоначальных экспериментов, физико-химические свойства боратов пирокатехинов не были охарактеризованы современными методами анализа в полной мере. Среди прочего исследователями занимало изучение одного из основных свойств таких комплексов – пониженной способности пирокатехинов к окислению в комплексе с боратом. Например, это нашло отражение в работе [2], где описано окисление адреналина. В последнее время появились работы, посвященные применению DOPA-боратов для нейтронной терапии меланомы [3]. Возможность клинического применения боратных комплексов также следует из их относительно малой токсичности [4].

На основании полученных нами ранее данных о физико-химических свойствах раствора DOPA, заключенного в липосомы [5], было выявлено некоторое ограничение его предполагаемого практического использования. Полученная липосомная форма DOPA предназначалась для лечения болезни Паркинсона. Однако малая растворимость DOPA в воде (2.5 мг/мл) не позволяла получать высокое соотношение активное вещество/липид. Мы сочли, что одним из возможных пу-

тей увеличения растворимости DOPA могло стать использование его боратных комплексов. Не исключалось также, что катехины в виде комплексных солей будут лучше удерживаться во внутри-



^{11}B -ЯМР-спектры моно-DOPA-бората 1-адамантиламмония (а) и моно-DOPA-бората аммония (б) в воде.

Сокращения: Ctl – катехины; DA – дофамин; 2-(3,4-дигидроксифенил)этиламин; DOPA – L-3,4-дигидроксифенилаланин; cPC – яичный фосфатидилхолин.

Автор для переписки.

липосомном объеме. Поэтому целью настоящей работы мы считали изучение свойств как самих DOPA- и DA-боратных комплексов, так и их липосомных форм.

Были получены комплексы, которые в качестве противоионов имели аммоний или 1-адамантиламмоний. 1-Аминоадамантан был выбран в связи с тем, что он также используется в качестве антипаркинсонического препарата ("Мидантан") [6]. В лечебной практике он нашел применение в сочетании с другими средствами лечения болезни Паркинсона, в частности DOPA. Поэтому связывание двух активных веществ может обеспечить

потенциально возможный синергизм лечебных свойств обоих соединений.

DOPA- и DA-бораты аммония и 1-адамантиламмония получали при взаимодействии борной кислоты и катехинов в присутствии карбоната аммония или 1-аминоадамантана при pH 6.5–7 (схема 1). При этом должна получаться равновесная смесь моно- (I–IV) и ди-Сtl-боратов (V–VIII).

Исследование реакционной смеси с помощью ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{11}B , ИК- и масс-спектрометрии подтвердили это предположение и позволили определить соотношение веществ в равновесной смеси.

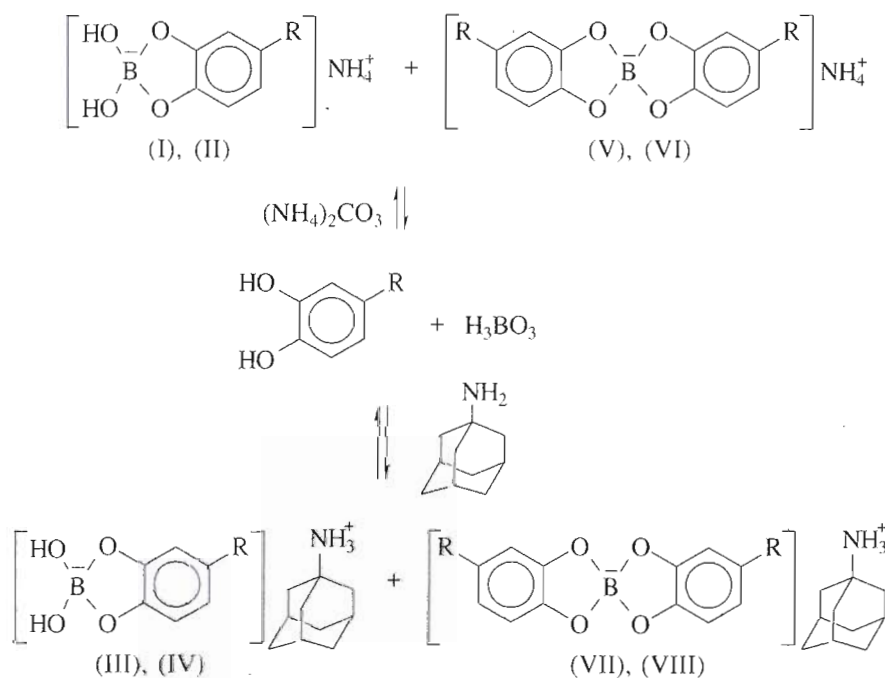


Схема 1.

$\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (производные дофамина (I), (III), (V), (VII));

$\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$ (производные DOPA (II), (IV), (VI), (VIII)).

В ^1H -ЯМР-спектре продуктов взаимодействия $\text{B}(\text{OH})_3$ и дофамина (в $^2\text{H}_2\text{O}$), взятых в мольном соотношении 1:1, наряду с сигналами ароматических протонов, исходных катехинов появляется новая группа сигналов с δ 6.35–6.24 м.д., которая может быть приписана ароматическим протонам пирокатехинового фрагмента, связанного с атомом бора [7]. Этот сложный сигнал представляет собой результат перекрывания трех дублетов. Их интегральная интенсивность в моно-DA-борате аммония составляет ~50% суммарного значения интенсивности ароматических протонов. Соотношение интенсивностей ароматических протонов дофамина и моно-DA-бората 1-адамантиламмония равно 1:4.

Замена $^2\text{H}_2\text{O}$ на $\text{DMSO}-d_6$ позволила выявить сигналы протонов NH_2 - и OH -групп, так как в этом растворителе обмен протонов подавляется. Протоны фенольных групп дофамина дают сигналы при 8.87 м.д. К протонам концевой NH_2 -группы относится широкий сигнал в виде синглета, химический сдвиг которого в исходной молекуле дофамина составляет 7.96 м.д. В ^1H -ЯМР-спектре ($\text{DMSO}-d_6$) продуктов взаимодействия борной кислоты и дофамина (1:1, моль/моль) неизменным оставался сигнал, относящийся к протонам концевой NH_2 -группы (δ 7.85 м.д.). Протоны гидроксильных групп, связанных с атомом бора, проявляются при δ 6.56 м.д.

Таблица 1. Интегральная интенсивность сигналов в ^{11}B -ЯМР-спектрах равновесных 0.5 М растворов моно-DOPA- и моно-DA-боратов в воде, pH 6.8

Соединение	Интегральная интенсивность, % от суммарной (номер соединения)		
	B(OH)_3	моно-Ctl-борат	ди-Ctl-борат
(I)	43	53 (I)	4 (V)
(II)	43	53 (II)	4 (VI)
(III)	20	80 (III)	0 (VII)
(IV)	26	74 (IV)	0 (VIII)

Кроме того, отсутствие изменений химических сдвигов в области алифатических протонов (2.91, т, 2H; 2.67, т, 2H) в спектрах моно-DA-бората как аммония, так 1-адамантиламмония, свидетельствует о том, что атом азота не вовлечен в координационную связь с бором.

Сигналы протонов комплексов с различным соотношением Ctl/B различаются очень мало. В спектрах ^{11}B -ЯМР сигналы, относящиеся к атомам бора с разным химическим окружением, различаются на несколько миллионных долей (рисунок). Растворы аммониевых солей полученных нами комплексов в воде давали три широких сигнала с химическими сдвигами δ 19.5, 13.9 и 8.3 м.д. Отнесение сигнала 19.5 м.д. было выполнено сравнением со спектром борной кислоты, в котором наблюдался сигнал с химическим сдвигом 19.5 м.д., а два других сигнала идентифицировали по литературным данным [8]. Сигнал с δ 13.9 м.д. соответствует эфиру $\text{Ctl}=\text{O}_2\text{BO}_2=\text{Ctl}$, а эфир $(\text{HO})_2\text{BO}_2=\text{Ctl}$ имеет сигнал с δ 8.3 м.д. Природа боковой цепи катехинов оказывает незначительное влияние на положение сигналов атома бора. Так, химические сдвиги сигналов в спектрах комплексов DOPA (II) и (VI) отличаются от химических сдвигов в спектрах соответствующих комплексов DA (I) и (V) лишь на +0.3 м.д. Вероятно, этот сдвиг – следствие индуктивного эффекта карбоксильной группы, которая уменьшает экранирование атома бора. Данные ^{11}B -ЯМР-исследований полученных комплексов представлены в табл. 1 и на рисунке.

Таким образом, при взаимодействии борной кислоты и катехинов, взятых в мольном соотношении 1:1, в условиях физиологического значения pH (6.8) в равновесной смеси присутствуют как борная кислота, так и ее комплексы. Из табл. 1 видно, что при 50% содержании моно-DA(DOPA)-бората аммония (I, II) в равновесной смеси количество комплексов (V) и (VI) не превышает 4%; в спектрах ^{11}B -ЯМР 1-адамантиламмониевых комплексов сигналы, соответствующие комплексам состава $\text{Ctl}=\text{O}_2\text{BO}_2=\text{Ctl}$ (VII), (VIII), не наблюдаются (рисунок, а).

Присутствие в равновесной смеси комплексов различного состава было также установлено с помощью масс-спектрометрии. Так, в спектре об-

разцов, полученных при растворении соединений (I) и (II), присутствовали пики, соответствующие как молекулярным ионам комплексов состава ($\text{Ctl}=\text{O}_2\text{BOH}$), так и ионом дикатехинборатов ($\text{Ctl}=\text{O}_2\text{BO}_2=\text{Ctl}$, m/z 313 и 401 для ди-DA-бората и ди-DOPA-бората соответственно); в соответствующих спектрах 1-адамантиламмониевых комплексов пики ди-Ctl-боратов отсутствовали.

Наличие в полученных хелатах координационной связи O–B–O было также зафиксировано с помощью дифференциальной ИК-спектроскопии [9]. В ИК-спектрах соединений (I)–(IV) появляются новые характеристические полосы поглощения при 1060, 904 и 940 см^{-1} , которые соответствуют валентным колебаниям связи B(IV)–O и B(IV)O–H [10].

Молекулы DOPA и дофамина кроме гидроксильных групп содержат аминогруппы, поэтому не исключено образование координационной связи N–B. Известно, что образование донорно-акцепторной связи N–B, как правило, сопровождается появлением характеристической полосы с волновым числом 1400 см^{-1} [11], которая не наблюдалась в спектрах исследуемых соединений. Таким образом, исходя из полученных экспериментальных данных можно предположить, что при взаимодействии борной кислоты с DOPA и DA образуются комплексы, в которых отсутствует координационная связь между атомами бора и азота и устанавливается мостиковая связь O–B–O.

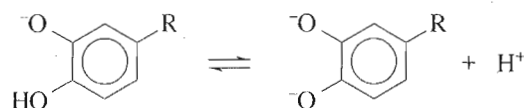
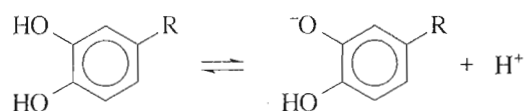
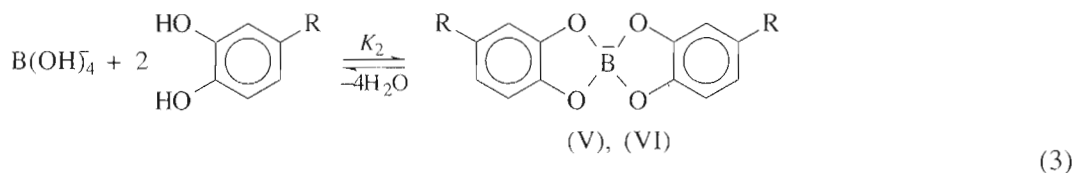
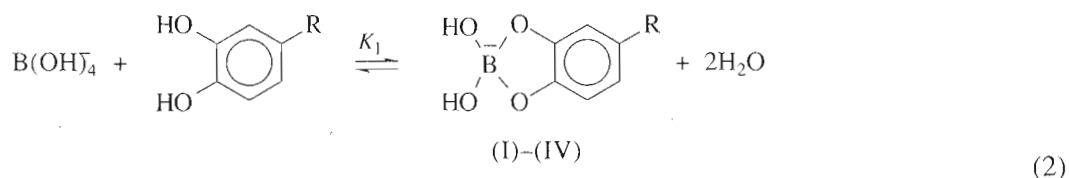
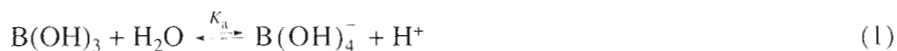
В настоящей работе для определения константы равновесия системы, состоящей из катехина и борат-аниона был использован кондуктометрический метод, не применявшийся для этих целей ранее. Особое значение имеет определение констант нестойкости DOPA(DA)-боратных солей 1-адамантиламмония, данные о которых в литературе отсутствуют.

Кондуктометрический метод (так же как и спектрофотометрический, криоскопический и калориметрический методы) не позволяет на основании экспериментального материала вычислить равновесные концентрации адденда или центрального иона. Путем измерения электропроводности можно, зная удельную и эквивалентную электропроводности раствора, рассчитать степень диссоциации, на основании которой затем

получить искомое значение константы диссоциации комплекса или обратную ей величину – константу образования.

Исследуемые комплексные соли относятся к бинарным электролитам, в которых бор четы-

рекоординирован, а лиганд является бидентантным [12]. При взаимодействии DOPA (DA) с борной кислотой в водных системах (pH 6.5–7) имеют место равновесные процессы, представленные на схеме 2.



(I), (III), (V): $R = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$ (дофамин) или

(II), (IV), (VI): $R = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_3^+)\text{-COO}^-$ (DOPA)

Схема 2.

Константы равновесия реакций 2, 3 можно записать в следующем виде:

$$K_1 = \frac{[\text{моно-СтI-комплекс}]}{[\text{B(OH)}_4^-][\text{CtI}]},$$

$$K_2 = \frac{[\text{ди-СтI-комплекс}]}{[\text{B(OH)}_4^-][\text{CtI}]^2}.$$

Сравнение значений K_1 и K_2 (табл. 2) показывает, что комплекс дофамина с противоионом аммонием (I) менее устойчив, чем аналогичный комплекс (III), где в качестве противоиона выступает адамантиламмоний. Значения констант равновесия соответствующих комплексов DOPA (II) и (IV) сопоставимы. Большей устойчивостью обладают комплексы двойного состава (V), (VI).

Имеющиеся экспериментальные данные характеризуют меньшую прочность боратных ком-

плексов по сравнению с устойчивостью координационной связи металл–DOPA(DA) [13]. Так, полученные константы боратных комплексов ниже известных значений равновесных констант комплексов DOPA с Cu^{2+} (7.7) и Mg^{2+} (4.7), но сопоставимы с константой комплекса с Ca^{2+} (2.7) [14].

При изучении электропроводности раствора моно-DOPA(DA)-бората аммония (17°C, pH 6.5-7.0) было установлено, что в исследуемой системе диссоциация соединений на составляющие катионы и анионы происходит быстро. Этот процесс характеризует вещества ионного типа. Высокой степенью диссоциации отличаются моно-Ctl-комплексы, тогда как ди-Ctl-комплексы относятся к малодиссоциирующим соединениям.

В случае моно-DOPA(DA)-бората 1-адамантиламмония по мере разбавления раствора комплекса происходит непрерывное увеличение сопротивления исследуемого раствора, что может

Таблица 2. Логарифмы констант образования катехин-боратных комплексов (рН 6.8)

Соединение	$\lg K_a(17^\circ\text{C})$
(I)	2.48 ± 0.04
(II)	2.75 ± 0.05
(III)	2.68 ± 0.05
(IV)	2.76 ± 0.05
(V)	4.00 ± 0.06
(VI)	4.03 ± 0.06

свидетельствовать об отсутствии в растворе примесей ди-СтI-комплексов (VII), (VIII), что подтверждается данными ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{11}B и ^1H (табл. 1).

В ходе экспериментов по определению растворимости комплексов в воде нами было установлено, что полученные соединения склонны к пересыщению, причем эта способность наиболее выражена в случае моно-DOPA-бората 1-адамантиламмония, что не позволило установить растворимость этого вещества с достаточной точностью.

Основываясь на полученных данных по физико-химическим свойствам моно-DOPA(DA)-боратов аммония и 1-адамантиламмония, мы перешли к изучению свойств липосомных форм, содержащих комплексы.

Гидратацией пленки, состоящей из яичного фосфатидилхолина (ePC) и холестерина (7 : 3, моль/моль), с последующим озвучиванием была получена 5% липосомная дисперсия. Во избежание осаждения невключенного комплексного соединения механическое встряхивание производили при 60°C .

Полученные малые мономеллярные везикулы отделяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100 от не включившегося в липосомы вещества. Для расчета эффективности включения использовали липосомную фракцию с комплексом и фракцию невключенного вещества. Этот параметр (P , %) может быть найден по формуле

$$P = (AV/(AV + A'V')) \times 100, \quad (4)$$

где A , A' – оптическое поглощение катехина (при 280 нм) в липосомной фракции с объемом V и во фракции с невключенным веществом (V') после шестикратного разбавления каждого образца этанолом. В качестве раствора сравнения использовали смесь этанол–вода (5 : 1).

Как оказалось, степень включения моно-DOPA(DA)-боратов аммония и 1-адамантиламмония для 5% липосомной дисперсии находится в пределах 5–7%, что является косвенным доказательством размера полученных липосом (до 100 нм),

так как в случае малых мономеллярных липосом для гидрофильных веществ степень включения однозначно определяется размером везикул и концентрацией липидов. Экспериментально было установлено, что предельно достижимая концентрация моно-DOPA(DA)-боратов аммония и 1-адамантиламмония внутри липосом составляет 0.8 М. При больших концентрациях формирование липосом становится затруднительным. Максимальное отношение активное вещество/липид, которого можно достичь в исследуемых липосомах, составляет 1 : 2 (моль/моль), что в 42 раза выше по сравнению с липосомными препаратами, приготовленными на основе растворов DOPA.

Комплексообразование, как можно предположить, также должно способствовать удерживанию дофамина во внутренней полости липосом, что было подтверждено в ходе изучения кинетики выхода моно-DA-боратов аммония и 1-адамантиламмония. Как оказалось, время полувыхода комплексов дофамина из липосом (не менее 29 сут) по крайней мере в 87 раз превышало соответствующее значение для липосомной формы, содержащей свободный катехин. Таким образом, исследование кинетики выхода комплексов из липосом продемонстрировало стабильность липосомных препаратов с включенными в них соединениями. Заряд и размер таких молекул препятствует их прохождению через углеводородный участок бислоя. Поэтому липосомная форма активного вещества в виде комплекса характеризуется устойчивостью во времени. Это еще одно преимущество липосом, содержащих комплекс, по сравнению с липосомной формой свободного катехина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы (борная кислота, карбонат аммония, 1-аминоадамантан) фирмы Sigma без дополнительной очистки; ePC ("Биолек", Харьков), индекс окисленности которого был меньше 0.2. УФ-спектры записывали на спектрофотометре Hitachi UV-160 (Япония). Липосомы озвучивали при охлаждении льдом с помощью диспергатора Sonifier 250 (Branson, Австрия) с мощностью прибора 20% от максимальной и частотой 44 кГц (0.5 с – озвучивание, 0.5 с – пауза) в течение 10 мин. Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-100; фракции детектировали с использованием УФ-детектора UV-1 (Pharmacia-LKB, Швеция) на длине волны 280 нм. Масс-спектры сняты на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (АО "Selmi", Сумы, Украина); ускоряющее напряжение 20 кВ, объем накапливаемых стартов 10000. ИК-спектры регистрировали на приборе Hitachi-270-30 data processor (Япония) в

области 400–4000 см^{-1} в таблетках KBr. Спектры ЯМР на ядрах ^1H и ^{11}B регистрировали на приборе Bruker MSL-200 (ФРГ). Рабочие частоты – 200.13 и 64.20 МГц для ядер ^1H и ^{11}B соответственно. ^{11}B -ЯМР-спектры снимали в H_2O , ^1H -ЯМР-спектры – в $\text{DMSO}-d_6$ и $^2\text{H}_2\text{O}$. Химические сдвиги (δ) приведены в миллионных долях относительно Me_4Si (^1H -ЯМР) и эфирата трехфтористого бора (^{11}B -ЯМР, внешний стандарт). Для получения ^{11}B -ЯМР-спектров аликвоту, содержащую исследуемый раствор, вносили в 5-мм ампулу, которую в свою очередь помещали в 10-мм ампулу, заполненную $^2\text{H}_2\text{O}$. Съемка образцов производилась с широкополосным подавлением взаимодействия с протонами. Время задержки 2.7 с, число накоплений 200–800.

Центрифугирование осуществляли на Labofuge A (Heraeus) при 2000g. Термостатирование проводили на приборе ТЭЛ-1 (Россия).

Кондуктометрические измерения проводили с использованием платиновых электродов и электроизмерительного прибора Е7-13 (Россия).

Моно-DA-борат аммония (I) и моно-DOPA-борат аммония (II). В 0.5 мл воды вносили катехин (0.5 ммоль) и борную кислоту (0.5 ммоль), затем по каплям вносили раствор 0.25 ммоль $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ в 0.5 мл воды и перемешивали при нагревании (60–80°C) 20 мин. Выдерживали смесь при комнатной температуре, выпавший осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством воды и высушивали в вакуумном эксикаторе. Выход моно-Ctl-комплекса составлял 50%, температура разложения – выше 240°C. Растворимость соединения (I) 5 г/100 г воды, соединения (II) – 2 г/100 г воды.

Комплекс (I). ИК-спектр* (KBr, ν , см^{-1}): 3532 осш (νOH), 2852 осш ($\text{H}\dots\text{OH}$, δNH_3^+), 1642 ср (δOH в H_2O), 1408 сл (δNH_4^+), 1122 сл и 1224 с ($\nu\text{CO} + \delta\text{B(IV)O} + \nu\text{O-B(IV)-O}$), 1062 осш (δOVO), 940 срш ($\nu_{\text{асим}}\text{B(IV)O}$), 820 ср и 904 сш ($\nu_{\text{сим}}\text{B(IV)O}$), 698 с (δOH), 586 ср ($\delta\text{O-B-O}$).

^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$, δ): 2.67 (2H, т, CH_2), 2.91 (2H, т, CH_2), 6.56 (2H, с, OH), 7.85 (2H, с, NH_2).

^{11}B -ЯМР-спектр (H_2O , δ , % (от суммарной интенсивности)): 19.5 (43 H_3BO_3), 13.9 (4 Ctl= O_2BO_2 =Ctl) и 8.3 (53 $(\text{HO})_2\text{BO}_2$ =Ctl).

Масс-спектр (m/z): 179 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{O}_2=\text{B-OH}$). В образце, приготовленном из фильтрата, наблюдался также пик с массовым числом

313, соответствующий комплексу (V) $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{O}_2=\text{B}=\text{O}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

Комплекс (II). ИК-спектр (KBr, ν , см^{-1}): 3512 осш (νOH), 2932 осш ($\text{H}\dots\text{OH}$, δNH_3^+), 1614 сш (δOH в H_2O), 1408 сл (δNH_4^+), 1142 сш и 1254 ср ($\nu\text{CO} + \nu\text{B(IV)O} + \delta\text{O-B(IV)-O}$), 1068 осш (δOVO), 952 срш ($\nu_{\text{асим}}\text{B(IV)O}$), 752 срш и 902 срш ($\nu_{\text{сим}}\text{B(IV)O}$), 698 с (δOH), 574 сл ($\delta\text{O-B-O}$).

^{11}B -ЯМР-спектр (H_2O , δ , % (от суммарной интенсивности)): 19.5 (43 H_3BO_3), 13.9 (4 Ctl= O_2BO_2 =Ctl) и 8.3 (53 $(\text{HO})_2\text{BO}_2$ =Ctl).

Масс-спектр (m/z): 223 ($\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{O}_2=\text{B-OH}$). В образце, приготовленном из фильтрата, наблюдался также пик с массовым числом 401, соответствующий комплексу (VI) ($\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{O}_2=\text{B}=\text{O}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$).

Моно-DA-борат 1-адамантиламмония (III), моно-DOPA-борат 1-адамантиламмония (IV). В 0.5 мл воды вносили по 0.5 ммоль катехина и H_3BO_3 . К нагретому до 60°C раствору по каплям добавляли 0.5 мл 1 М спиртового раствора 1-аминоадамантиана, который готовили непосредственно перед получением комплекса. После выдерживания (2 ч) при комнатной температуре выпадал осадок, его отфильтровывали, промывали небольшим количеством воды, сушили в вакууме. Выход 86%, температура разложения выше 300°C. Растворимость соединения (III) 4 г/100 г воды. Растворимость комплекса (IV) не удалось определить, так как водный раствор этого комплексного соединения склонен к пересыщению.

Соединение (III). ИК-спектр (KBr, ν , см^{-1}): 3516 осш (νOH), 2932 осш ($\text{H}\dots\text{OH}$, δNH_3^+), 1224 с и 1120 сл ($\nu\text{CO} + \nu\text{B(IV)O} + \delta\text{O-B(IV)-O}$), 1060 осш (δOVO), 942 срш ($\nu_{\text{асим}}\text{B(IV)O}$), 844 ср и 902 сш ($\nu_{\text{сим}}\text{B(IV)O}$), 698 с (δOH), 586 ср ($\delta\text{O-B-O}$).

^{11}B -ЯМР-спектр (H_2O , δ , % (от суммарной интенсивности)): 19.5 (20 H_3BO_3), 8.3 (74 $(\text{HO})_2\text{BO}_2$ =Ctl).

Масс-спектр (m/z): 179 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{O}_2=\text{B-OH}$).

Соединение (IV). ИК (KBr, ν , см^{-1}): 3512 осш (νOH), 2852 осш ($\text{H}\dots\text{OH}$, δNH_3^+), 1218 с и 1144 сш ($\nu\text{CO} + \nu\text{B(IV)O} + \delta\text{O-B(IV)-O}$), 1054 осш (δOVO), 952 сш ($\nu_{\text{асим}}\text{B(IV)O}$), 752 сш и 904 срш ($\nu_{\text{сим}}\text{B(IV)O}$), 696 с (δOH), 578 сл ($\delta\text{O-B-O}$).

^{11}B -ЯМР-спектр (H_2O , δ , % (от суммарной интенсивности)): 19.5 (20 H_3BO_3), 8.3 (80 $(\text{HO})_2\text{BO}_2$ =Ctl).

Масс-спектр (m/z): 223 ($\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_3)\text{O}_2=\text{B-OH}$).

Определение константы диссоциации комплексов по электропроводности их водных растворов. Калибровку осуществляли с помощью раствора KCl, для получения которого использо-

* Сокращения, использованные в описании ИК-спектра: осш – очень сильная, широкая; срш – средней интенсивности, широкая; сш – сильная, широкая; ср – средней интенсивности; с – сильная; сл – слабая.

вали бидистиллированную воду и дважды перекристаллизованную соль. Из опытных и табличных значений удельной электропроводности 0.01 и 0.02 М растворов KCl при температуре опыта находили поправку системы и среднее ее значение использовали для дальнейших расчетов. Бидистиллированную воду насыщали азотом.

Готовили 0.1 М раствор борной кислоты в 0.1 и 0.2 М растворах DOPA или DA. Ячейку с исследуемым раствором помещали в термостатируемую баню ($17 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Перед каждым измерением раствор тщательно перемешивали. Переносили 1 мл образца в измерительную ячейку. Конечный объем системы доводили до 20 мл бидистиллированной, насыщенной азотом водой. Дальнейшее измерение электропроводности проводили при постоянном объеме. Эквивалентную электропроводность при бесконечном разбавлении находили путем линейной экстраполяции зависимости $1/\lambda_c = f(C\lambda_c)$. Далее найденное значение $1/\lambda_\infty$ подставляли в формулу (5) (следует из уравнения Оствальда) и вычисляли K_d или обратную ей величину – константу образования комплекса (K_a):

$$K_a = \frac{1 - \lambda_c/\lambda_\infty}{C(\lambda_c/\lambda_\infty)^2}, \quad (5)$$

где λ_c – эквивалентная электропроводность при концентрации C ; λ_∞ – эквивалентная электропроводность при бесконечном разбавлении.

Получение мультиламеллярных липосом. Вследствие склонности водных растворов комплексов к пересыщению для получения максимальной загрузки их липосомных форм использовали пересыщенные растворы. Раствор ePC и холестерина в соотношении 7 : 3 (моль/моль) в хлороформе упаривали в круглодонной колбе до постоянного веса, добавляли в колбу пересыщенный раствор моно-DOPA(DA)-бората аммония (0.5 М) или 1-адамантиламмония (0.8 М) (в последнем случае при 60°C) до конечной суммарной концентрации липидов 5%. Раствор насыщали азотом и затем встряхивали колбу на механическом встряхивателе 20–30 мин.

Получение мономламеллярных липосом. Мультиламеллярные липосомы подвергали ультразвуковой обработке в течение 5 мин при охлаждении льдом циклами диспергирование/остановка 0.5 с/0.5 с.

Гель-фильтрация липосом. Суспензию озвученных липосом (0.2 мл) наносили на колонку с 25 мл сефадекса G-100 и элюировали 0.9% раствором NaCl со скоростью 2 мл/мин. Собирали первую фракцию, содержащую липосомы, и фракцию с невключенным веществом, поглощающие при 280 нм.

Определение эффективности включения DOPA и дофамина в липосомы. К аликвоте липосомной фракции (0.2 мл) добавляли 1 мл этанола и измеряли оптическое поглощение при 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали смесь этанол–вода (5 : 1, по объему). Аналогично обрабатывали аликвоту фракции, содержащей невключенное вещество, и измеряли оптическое поглощение. Эффективность включения вычисляли по формуле 4.

Кинетика высвобождения комплексов из липосом. Суспензия липосом (5%) в 0.9% растворе NaCl (pH 6.8) выдерживали 5 сут при комнатной температуре. Через 1, 2 ч, 1 и 5 сут отбирали аликвоты липосомной дисперсии и центрифугировали. Затем спектрофотометрически определяли содержание вещества в супернатанте и внутри липосом после их разрушения этанолом (1 : 5, по объему). Только по истечении 5 сут был зафиксирован выход моно-DA-бората 1-адамантиламмония: 0.4% исходного количества. В экспериментах с моно-DOPA-боратами аммония и 1-адамантиламмония выхода вещества не отмечалось.

Работа проводилась при поддержке РФФИ (грант № 97-04-49112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schafer H. // Z. Anorg. Allg. Chem. 1942. V. 250. P. 127–143.
2. Antikainen P.J., Terauen K. // Suom. Kem. 1966. V. 39. P. 285–288.
3. Yoshino K., Okamoto M., Kakihana H., Yoshihiro M. // Proc. 2nd Int. Symp. on Neutron Capture Therapy. 1986. P. 291–302.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. I. М.: Медицина, 1988. С. 394.
5. Борисова Н.В., Каплун А.П., Богомолов О.В., Григорьев В.Б., Юрасов В.В., Никушкин Е.В., Крыжановский Г.Н., Швец В.И. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 851–856.
6. Камянов И.М., Полис Я.Ю., Купник А.Г. Мидантан и его применение в терапии и профилактике. М.: Медицина, 1987. С. 3–10.
7. Robert K.M., Nachtrieb N.H. // Inorg. Chem. 1967. V. 6. P. 1189–1192.
8. Mohr S., Heller G., Timper U., Woller K.-H. // Z. Naturforsch. B. 1990. V. 45. P. 308–322.
9. Желиговская Н.Н., Черняев И.И. Химия комплексных соединений. М.: Высш. шк., 1966. С. 356–363.
10. Foil A., Wilkins M., Wilkins Ch.H. // Anal. Chem. 1952. V. 24. P. 1253.
11. Алекперов Э.Р., Резник А.М. // Журн. координ. химии. 1993. № 1. С. 5–14.
12. Pizer R., Babcoch L. // Inorg. Chem. 1977. V. 16. P. 15–18.

13. Rajan K.S., Skipkus A., Marks G.E., Davis J.M. // Bioinorg. Chem. 1976. V. 6. P. 93–117.
14. Rajan K.S., Mainer S. // Bioinorg. Chem. 1978. V. 9. P. 187–203.

Physicochemical Properties of Borate Derivatives of DOPA, Dopamine, and Their Liposomic Forms

N. V. Borisova*, V. I. Kryukov**, A. P. Kaplun*#, and V. I. Shvets*

*Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

To increase the solubility of *L*-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and dopamine (DA) incorporated in liposomes, it was suggested to convert them into ammonium and 1-adamantylammonium borate complexes. The structure of these complexes was studied by ^{11}B and ^1H NMR, IR, and mass spectrometry and conductometry. The liposomic form of the complexes is characterized by a high active compound/lipid molar ratio (0.5). Catechols in the form of complex salts are retained better within the inner volume of liposomes.

Keywords: phosphatidylcholine from egg yolk, DOPA, dopamine, liposomes, borate complexes, 1-aminoadamantane, Parkinson's disease

To whom correspondence should be addressed.