

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



Нгуен Тхи Суен

**ИЗОМЕРИЯ, КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ И
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНИЗИРОВАННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ СПИРОПИРАНОВ ОКСАИНДАНОВОГО РЯДА**

1.4.4 – Физическая Химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научные руководители:

д. х. н., доцент

Щербаков Игорь Николаевич

Ростов-на-Дону – 2024

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, я хотела бы выразить свое уважение и огромную благодарность д.х.н., доценту Щербакову Игорю Николаевичу; д.х.н., проф. Лукову Владимиру Викторовичу и ст. преп., к.х.н. Буланову Антонию Олеговичу, которые всегда оказывали мне внимание, горячо помогали и направляли меня к завершению этой диссертации.

Я выражаю огромную благодарность кафедре физической и коллоидной химии имени проф. В. А. Когана, Химического факультета Южного федерального университета, которая с энтузиазмом помогла и содействовала мне в проведении научных экспериментов. Выражаю благодарность следующим группам: Лаборатории фотохимии, НИИ физической и органической химии; Учебно-научной лаборатории резонансной спектроскопии кафедры химии природных и высокомолекулярных соединений; и ЦНИЦ “Высокопроизводительные вычисления” Южного федерального университета за помощь в анализе результатов.

Выражаю благодарность Министерству образования и подготовки кадров Вьетнама; и Министерству науки и высшего образования Российской Федерации за предоставление стипендий и создание условий для моего обучения и работы в России.

Оглавление

Введение.....	1
Глава 1. Литературный обзор.....	8
1.1 Особенности строения спиропиранов.....	8
1.2 Методы синтеза спиропиранов.....	10
1.3 Свойства спиропиранов.....	14
1.3.1 Общие свойства.....	14
1.3.2 Фотохромные свойства спиропиранов.....	20
1.4 Применение спиропиранов.....	25
1.4.1 Приложения в оптических устройствах.....	25
1.4.2 Аналитическое применение спиропиранов.....	27
1.4.3 Применения в биохимии.....	38
Глава 2. Экспериментальная часть.....	44
2.1 Реагенты и оборудование.....	44
2.2 Синтез соединений.....	45
2.2.1 Синтез промежуточных продуктов.....	45
2.2.2 Синтез тиосемикарбазонов.....	51
2.2.3 Синтез енаминокетонов.....	55
2.3 Методика квантово-химических исследований.....	60
2.4 Использование тиосемикарбазона Тп8 для аналитического обнаружения аминокислот.....	60
2.5 Определение биологической активности.....	62
2.5.1 Анализ цитотоксичности <i>in vitro</i>	62
2.5.2 Определение антиоксидантной активности методом DPPH.....	63
2.6 Прогнозирование фармакокинетики и прогноз токсичности (ADMET).....	64
2.7 Молекулярный докинг.....	64

Глава 3. Обсуждение результатов	67
3.1 Тиосемикарбазоны	67
3.1.1 Результаты структурных исследований методами ИК, ЯМР спектроскопии и электронной спектроскопии	67
3.1.2 Квантово-химические исследования	76
3.2 Енаминокетоны.....	79
3.2.1 Результаты структурных исследований методами ИК, ЯМР спектроскопии и электронной спектроскопии	80
3.2.2 Квантово-химические исследования	90
3.2.3 Рентгеноструктурный анализ (РСА).....	94
3.3 Исследование комплексообразования в растворе.....	96
3.4 Фотохромные свойства соединений.....	103
3.5 Использование тиосемикарбазона Тп8 для аналитического обнаружения аминокислот	110
3.6 Тестирование на биологическую активность.....	112
3.6.1 Изучение <i>in vitro</i> противораковой активности	112
3.6.2 Результаты тестирования антиоксидантной активности по системе DPPH	115
3.7 Прогнозирование фармакокинетики и прогноз токсичности (ADMET).....	116
3.8 Моделирование методом молекулярного докинга	118
3.8.1 Оценка модели (re-docking).....	118
3.8.2 Результаты молекулярного докинга тиосемикарбазонов и енаминокетонов	119
Заключение	125
Список литературы	127
Приложение	152

Список сокращений и условных обозначений

A549	Клеточная культура рака легких
a-acc	Количество акцепторов водородной связи
a-don	Количество доноров водородных связей
APT	Attached-Proton-Test
ADMET	(Absorption, Distribution, Excretion, Metabolism, Toxicity) Абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность
BIPS	1',3'-дигидроспиро(2H-1-бензопиран-2,2'-(2H)-индол)
b-rotN	Количество вращающихся связей
Cys	L-цистеин
DFT	(Density functional theory) Теория функционала плотности
DPPH	1,1-дифенил-2-пикрилгидразил
EC ₅₀	Полумаксимальная эффективная концентрация
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
Gly	L-глицин
GSH	γ-глутамил-цистеинил-глицин (L-глутатион)
Hcy	L-гомоцистеин
Hep-G2	Клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы
hERG	Ген специфических калиевых каналов сердца
HA	(Human intestinal absorption) Всасывание в кишечнике человека
IC ₅₀	Концентрация полумаксимального ингибирования
KB	Клетки плоскоклеточной карциномы полости рта
MC	Открытая мероцианиновая форма
MCF-7	Клеточная линия карциномы молочной железы
Met	L-метионин
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид
OD	(Optical density) Оптическая плотность
PCA	Рентгеноструктурный анализ
PCM	(Polarizable continuum model) Модель поляризуемого континуума

RMSD	(Root-mean-square deviation) Среднее квадратичное отклонение
SP	Закрытая спироформа
TPSA	Площадь полярной поверхности
TK	(Tyrosine kinase) Домен тирозинкиназы
ВЗМО	Высшая занятая молекулярная орбиталь
DMCO	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
дцРНК	Двухцепочечная РНК (Рибонуклеиновая кислота)
КЧ	Координационное число
НСМО	Нижняя свободная молекулярная орбиталь
ЯМР	Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Введение

Актуальность темы. Одним из наиболее актуальных направлений поиска новых полифункциональных материалов является молекулярный дизайн и направленный синтез соединений, содержащих химически связанные, взаимовлияющие фрагменты, способные к отклику на определенные виды физических воздействий. Такое “гибридное” строение открывает возможность их использования в качестве молекулярных переключателей (фото-, термо-, сольвато-, магнито- и проч.), вентилях, сенсоров, что востребовано в нелинейной оптике, спинтронике, хемосенсорике, молекулярной электронике и т. д. [1, 2]. Большой интерес для исследования представляют спиропираны и их производные, способные проявлять фото-, термо-, сольватохромные свойства. Спиропираны представляют собой класс гетероциклических соединений, которые особенно привлекательны из-за различий в конформации и физико-химических свойствах взаимопревращающихся изомеров. Изомер “закрытой” формы, названный спиропиран (SP), содержит связь $C_{\text{spiro}}-O$, в результате чего две части молекулы расположены практически перпендикулярно (рис. 1).

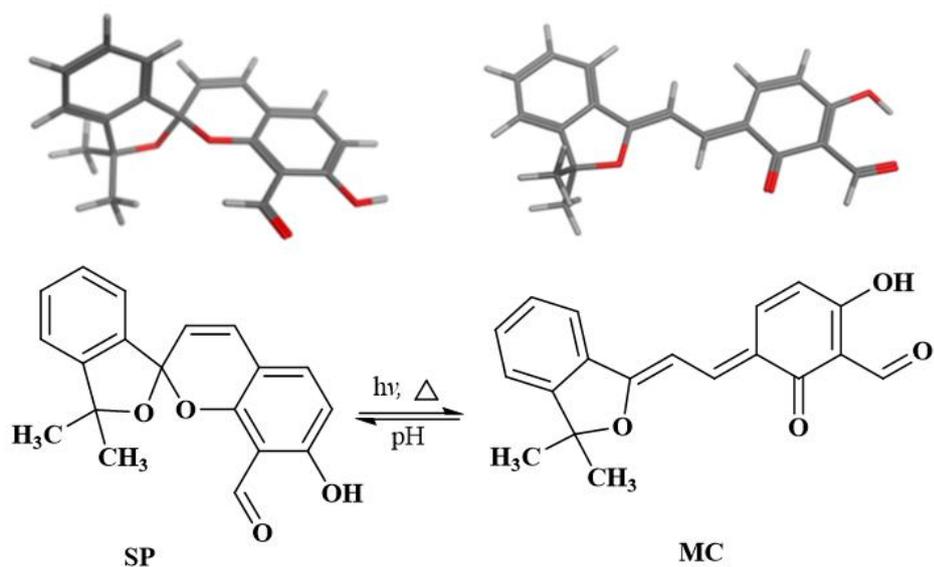


Рисунок 1. “Закрытая” спироформа (SP) и “открытая” мероцианиновая форма (MC) спиропирана.

Молекулярный каркас не содержит заряженных групп, и из-за “скрученной” конформации сопряжение π -электронов между двумя частями невозможно. УФ-фотовозбуждение может вызывать разрыв $C_{\text{спиро}}-O$ связи и ряд процессов *цис-транс*-изомеризации вокруг двойных связей. Образующийся изомер, называемый мероцианином (MC), имеет плоскую конформацию, а также протяженную делокализованную π -электронную систему. Это позволяет молекуле поглощать видимый свет, а также проявлять флуоресценцию в том же диапазоне длин волн [3-6].

Кроме того, различные факторы, такие как pH, окислительно-восстановительные реакции, природа растворителя и температура, могут сместить положение равновесия между формами SP и MC. Химическую функционализацию можно проводить в нескольких положениях молекулярного каркаса с минимальным влиянием на энергию активации процесса переключения. Это облегчает создание молекул с улучшенными и настраиваемыми сенсорными возможностями, а также позволяет их включение в полимеры, биомолекулы, поверхности и широкий спектр наноархитектур для получения функциональных материалов.

В этой связи задача получения новых производных спиропиранов, способных взаимодействовать с ионами металлов, представляется особенно актуальной, как в плане получения веществ, способных найти широкое прикладное применение, так и для современной фотохимии, в качестве новых объектов исследований, которые могут проявлять фотохимическую активность. Разработка теоретических моделей с использованием квантово-химического моделирования строения таких молекул позволит в дальнейшем выработать надежную теоретическую основу для прогнозирования свойств подобных систем [4, 7-11].

Введение тиосемикарбазоновой и енаминокетонной группы в бензопирановую часть молекулы спиропиранов приводит к образованию полидентатных лигандных систем, способных к образованию моно- и

полиядерных координационных соединений. Поиск различных путей функционализации спиропиранов позволяет в итоге получать полифункциональные молекулы на их основе, способные найти применение в нелинейной оптике, биохимии, молекулярной электронике, и материаловедении.

Именно по этим причинам была выбрана тема: **«Изомерия, комплексообразующая способность и биологическая активность функционализированных производных спиропиранов оксаинданового ряда».**

Цели работы. Целью исследования был синтез соединений на основе 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана], способных образовывать координационные соединения с ионами *3d*-металлов и обладающих потенциальной биологической активностью; теоретическое моделирование и экспериментальное исследование строения и их свойств.

Для достижения цели необходимо решить ряд задач:

1. Синтез и препаративное выделение хелатофорно функционализированных производных спиропиранов оксаинданового ряда на основе первичных аминов и тиосемикарбазидов, способных выступать полидентантными лигандами при взаимодействии с *3d*-металлами.

2. Физико-химическое исследование строения полученных соединений. Квантово-химическое моделирование пространственного и электронного строения их изомерных форм.

3. Изучение фотохимических свойств соединений и их комплексообразующей способности с ионами *3d*-металлов в растворе.

4. Изучение биологической активности *in vitro* синтезированных соединений.

5. Прогнозирование фармакологических свойств веществ и определение основных токсикологических параметров полученных соединений. Построение моделей молекулярного докинга для оценки и анализа способности связывания

тиосемикарбазонов и енаминокетонов с ферментом тирозинкиназой, в частности с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Оценка корреляция между энергией связи, вычисленной с помощью молекулярного докинга, и биологической активностью *in vitro*.

Научная новизна. На основе 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] [12] были синтезированы ряд новых енаминокетонов и тиосемикарбазонов, содержащих функциональные заместители в положении 7 и 8 бензопирановой части молекулы, выступающие в качестве комплексообразующего узла.

Показано, что конденсация 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с тиосемикарбазидами приводит к образованию тиосемикарбазонов с “закрытым” спиропирановым циклом, а реакция с первичными аминами приводит к сопряженной бензондно-хиноидной перегруппировке с раскрытием пиранового цикла и образованием соответствующих енаминокетонов.

Установлено, что взаимодействие тиосемикарбазонов с ионами металлов приводит к раскрытию спиропиранового цикла и стабилизации в комплексе лиганда в мероцианиновой форме.

В случае тиосемикарбазонов **Tn1**, **Tn8** - продуктов взаимодействия 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с N-изопропилгидразинкарботиоамидом и N-бензилгидразинкарботиоамидом наблюдаются фотохромное поведение. Для енаминокетонов **En1**, **En2** - продуктов взаимодействия 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2H-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с аминоэтанолом и изопропиламином - зарегистрирован обратный фотохромизм.

Показано, что тиосемикарбазон **Tn8** может быть использован в качестве реагента для спектрофотометрического и кинетического метода определения L-глутатиона в смеси аминокислот.

Проведенные испытания противоопухолевой активности *in vitro* на четырех линиях раковых клеток показали, что тиосемикарбазоны проявляют высокую активность по отношению к клеткам рака легкого A549 и плоскоклеточной карциномы полости рта KB. Это показывает очень многообещающий потенциал для медицинского применения этих соединений.

Впервые методом молекулярного докинга оценена способность тиосемикарбазонов и енаминокетонов ингибировать фермент EGFR. Показано, что между вычисленной энергией связи тиосемикарбазонов с целевым белком (S) и экспериментальным значением биологической активности соединений по отношению к клеточным линиям рака плоскоклеточной карциномы полости рта KB и карциномы молочной железы MCF-7 (отрицательным логарифмом IC₅₀) наблюдается существенная корреляция.

Практическая значимость. Предлагаемые в настоящей диссертационной работе синтетические подходы позволяют разрабатывать методы получения новых производных спиропиранов, способных к хелатированию ионов металлов, что может быть использовано для дальнейших исследований в этой области на химическом факультете ЮФУ и других научных подразделениях.

Получение данные моделирования методом молекулярного докинга взаимодействия тиосемикарбазонов и енаминокетонов с ферментом EGFR и определения *in vitro* цитотоксической активности позволит проводить направленный выбор перспективных эффективных соединений для лечения различных форм рака.

Разработанные методики аналитического спектрофотометрического и кинетического определения L-глутатиона в присутствии тиосемикарбазона **Tn8** могут быть использованы для анализа смеси аминокислот.

Личный вклад автора. Данная диссертация является настоящей личной исследовательской работой, автором самостоятельно проведен обзор литературы, осуществлен синтез изучаемых веществ, получены монокристаллические образцы, проведено физико-химическое исследование,

анализ и интерпретация экспериментальных данных, выполнены квантово-химические расчеты и молекулярное моделирование взаимодействия соединений с целевым белком EGFR методом докинга. В диссертации также использован ряд комментариев, оценок, а также данные других авторов, все с цитатами и примечаниями к источникам. Получение спектров ЯМР проводилось в Учебно-научной лаборатории резонансной спектроскопии кафедры химии природных и высокомолекулярных соединений, ЮФУ. Рентгеноструктурный анализ проводился в НИЦ «Курчатовский институт», Москва. Эксперименты по анализу противоопухолевой и антиоксидантной активности соединений проводились в лаборатории прикладной биохимии Химического института и биологической лаборатории Биологического института, Вьетнамской академии наук и технологий.

На защиту выносятся:

1. Результаты физико-химического исследования полученных соединений методами ЯМР, ИК, электронной спектроскопии, рентгеноструктурного анализа.
2. Результаты квантово-химического моделирования электронного и пространственного строения лигандных систем и координационных соединений в рамках методов DFT (B3LYP/6-311++G(d,p)) и (B3LYP/6-311G(d)).
3. Результаты исследования фотохимической активности полученных соединений в растворах и способности образовывать комплексы с различными металлами в растворе.
4. Определение антиоксидантной активности и противораковой активности полученных соединений методами анализа DPPH *in vitro* и анализ цитотоксичности *in vitro*.
5. Исследования *in silico* полученных соединений, в том числе: прогнозирование фармакокинетики ADMET, лекарственного подобия,

токсичности соединений и результаты молекулярного докинга соединений с ферментом EGFR.

Степень достоверности и апробация работы. Основные результаты диссертации опубликованы в 11 публикациях, в том числе 5 статьях в журналах рекомендованных для опубликования основных результатов диссертационного исследования: «Russian Journal of General Chemistry», «Журнал структурной химии», «Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)», и «Журнал аналитической химии». Апробация результатов диссертационной работы было проведено на 6 конференциях: XVI Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений», г. Туапсе (2019); XVII Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений», г. Туапсе (2020), VI Всероссийская конференция «Химия: достижения и перспективы», Ростов-на-Дону (2021); VII Всероссийская конференция «Химия: достижения и перспективы», Ростов-на-Дону (2022); XVI Международная научнопрактическая конференция «Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии», г. Астрахань (2022), XIX Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений», г. Туапсе, (2022).

Исследования проводились при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 21-53-54007 Вьет-а).

Структура и объем диссертации. Структура диссертации включает 171 страницу: введение, 3 главы, заключение и приложение. Диссертация содержит 97 рисунков, 8 таблиц, 14 страниц приложений и 184 цитируемых литературных источника.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Особенности строения спиропиранов

Спиропираны были впервые синтезированы и охарактеризованы в начале 20-го века, были проведены обширные исследования по синтезу новых производных для повышения эффективности их практического применения в различных областях [13-16].

Спиропиран - это общий термин для соединений, которые имеют два гетероароматических кольца (одно из которых является пирановым кольцом), связанные между собой sp^3 -гибридизованным атомом углерода (рис. 1.1). За счет sp^3 -гибридизованного атома углерода (C_{spiro}) два кольца в молекуле находятся в ортогональных плоскостях, и сопряжение отсутствует, эту замкнутую циклическую форму обычно называют формой SP [17-20]. Ar_1 и Ar_2 могут представлять собой бензольное, нафталиновое, индолинольное, тиофенольное кольца или другие ароматические ядра (включая гетероциклические кольца).

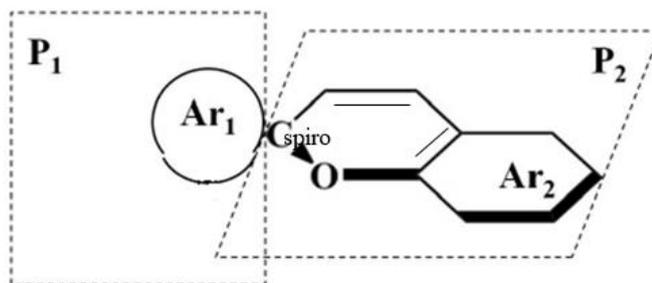


Рисунок 1.1. Основная структура спиропирана [21].

В молекуле спиропирана происходит перенос электрона между двумя кольцами [22, 23]. Большинство пиков в электронных спектрах поглощения спиропиранов с циклическим кольцом проявляются в УФ-области спектра (200–350 нм) и их раствор бесцветен или слабо окрашен. После облучения УФ-светом распределение электронов изменяются в значительной степени за счет разрыва связи $C_{\text{spiro}}-O$ [24]. Исходные два ортогональных кольца становятся компланарными, и вся молекула образует большую сопряженную π -систему. Это сопровождается bathochromным смещением спектра поглощения в область

длинных волн более 400 нм, и переходом из бесцветной формы в окрашенную. Структуры с разорванными связями $C_{\text{spiro}}-O$ называются “открытыми” формами, как мероцианиновый краситель; поэтому такие изомеры называют фотомероцианинами (или MC) (рис. 1.2).

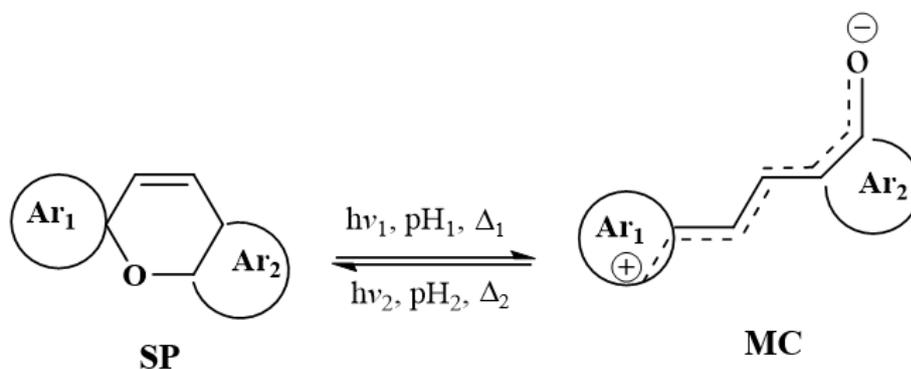


Рисунок 1.2. Реакция раскрытия/закрытия спиропиранового цикла.

Нефотохромный спиропиран, в том числе многофункциональный индолин-пирановый гибрид, впервые был описан Декером в 1908 г. Декер ввел термин “спиропиран” для описания недавно открытого хирального центра двойного пирана [13]. В последующие десятилетия сообщалось о многих вариациях спиропирана, как показано на рис. 1.3.

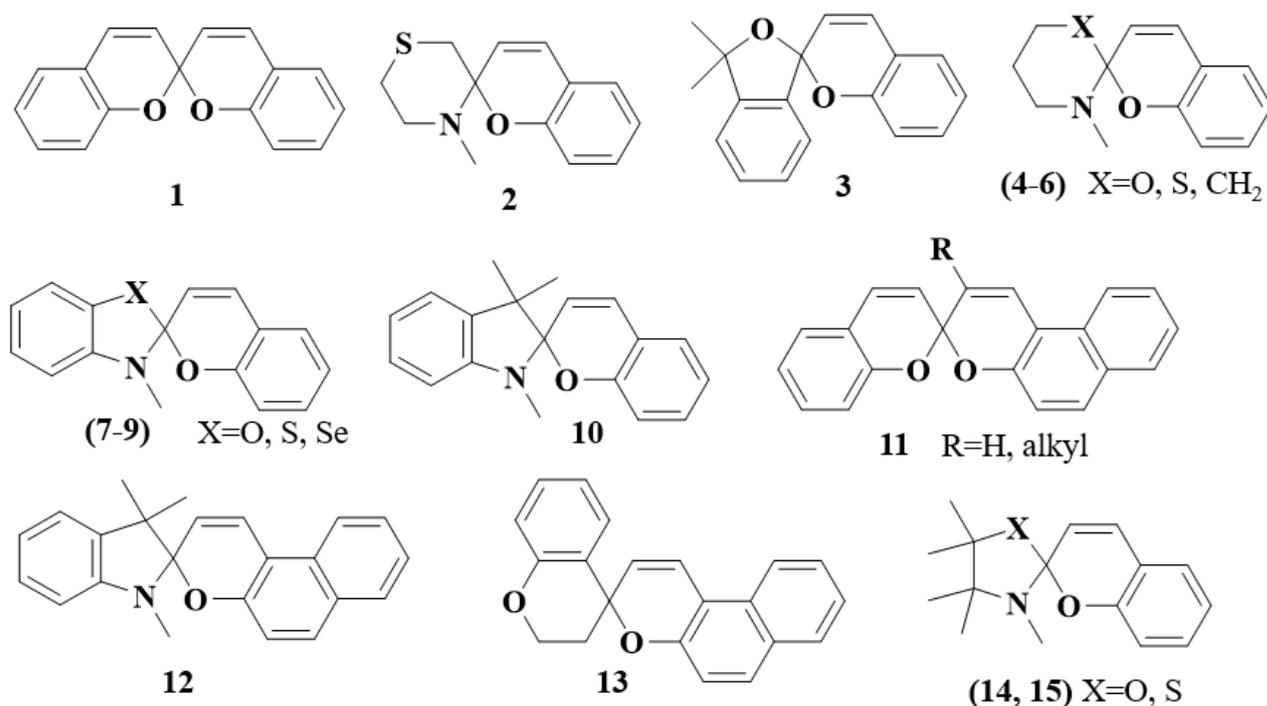


Рисунок 1.3. Различные структуры спиропиранов.

Существует несколько распространенных типов структур: дибензоспиропираны **1**; тиазиновые спиропираны **2**; изобензофурановые спиропираны **3**; 1,3-оксазиновые спиропираны **4**; 1,3-тиазиновые спиропираны **5**; пиперидиновые спиропираны **6**; бензоксазолиновые спиропираны **7**; бензотиазолиновые спиропираны **8**; бензоселеназолиновые спиропираны **9**; индолиновые спиропираны **10**; нафтоспиропираны **11**; индолинонафтоспиропираны **12**; бензонафтоспиропираны **13**; оксазолидиновые спиропираны **14**; тиазолидиновые спиропираны **15** [12, 15, 19, 20, 25-31].

Подавляющее большинство исследований в настоящее время посвящено спиропиранам индолинового ряда **10** из-за простоты синтеза. Их можно легко включать в различные материалы, включая полимеры и стекла, что делает их пригодными для различных применений. Однако эти соединения имеют и ряд недостатков, например, низкую фотостабильность и склонность к гидролизу [32, 33]. Поэтому поиск и создание новых гетероциклических систем для создания спиропиранов, несомненно, является важной и актуальной задачей.

1.2 Методы синтеза спиропиранов

Спиропиран можно синтезировать несколькими путями. Как показано на рис. 1.4, можно провести 2+4 (один реагент предоставляет атомы C² и C³ пиранового цикла, а второй - атомы C⁴, C⁵, C⁶ и атом кислорода пиранового цикла) или 3+3 (один реагент является источником C², C³ и C⁴, а другой обеспечивает C⁵, C⁶ и атом кислорода) циклоприсоединение. В третьем подходе можно получить спиропиран, а затем ввести необходимые новые заместители или трансформировать уже присутствующие [34].

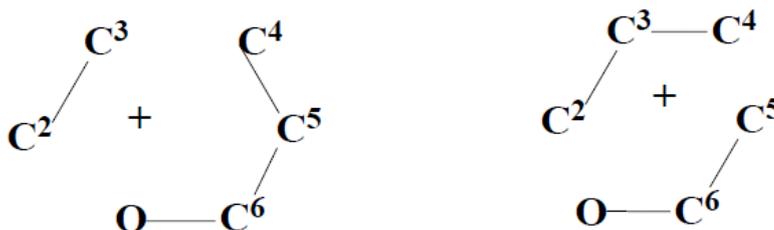


Рисунок 1.4. Общая схема синтеза спиропиранов.

Первый метод является наиболее распространенным: Конденсация метиленовых оснований (или их предшественников) с *o*-гидроксиароматическим альдегидами. Этот метод характерен для синтеза спиропиранов индолинового ряда. На рис. 1.5 представлен пример конденсации 2-алкилгетероциклического метиленового основания **16** с 2-гидроксииненасыщенной альдегидной группой (которая обычно является частью ароматического кольца, как в салициловом альдегиде). Таким же образом в реакцию вступают и 2-алкилгетероциклические четвертичные аммониевые соли [34-38]. Этим методом может быть получен широкий ассортимент классов спиропиранов. Доступность 1,2,3,3-тетраалкил-3Н-индолениниевых солей и салицилового альдегида привели к появлению большого количества спиро-(2Н-1-бензопиран-2,2'-индолина) или 1',3'-дигидроспиро (2Н-1-бензопиран-2,2'-(2Н)-индола) (BIPS) [34].

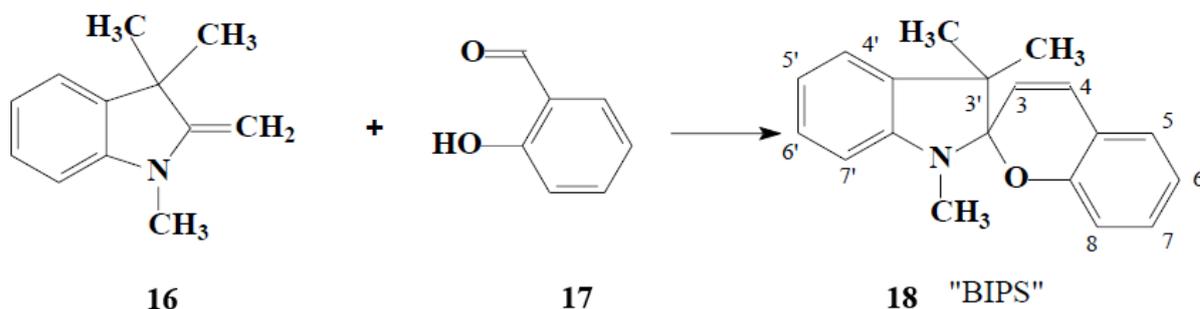


Рисунок 1.5. Схема синтеза 1',3'-дигидроспиро (2Н-1-бензопиран-2,2'-(2Н)-индола) (BIPS).

Второй метод: Получение спиропиранов конденсацией *o*-гидроксиароматических альдегидов с солями гетероциклических катионов, содержащими активные метиленовые группы. Стандартной процедурой в этом случае является конденсация *o*-гидроксиароматических альдегидов с солями гетероциклических катионов с последующим удалением элементов кислоты из полученной стироловой соли газообразным аммиаком или аминами.

В научном коллективе Южного федерального университета разработали двухстадийную методику синтеза спиропиранов бензоксазинонового ряда с

препаративным выделением стироловой соли **20**. Последующее удаление элементов хлорной кислоты из соединений **20** третичными триэтиламинами привело к образованию спиропиранов **21** (рис. 1.6) [39].

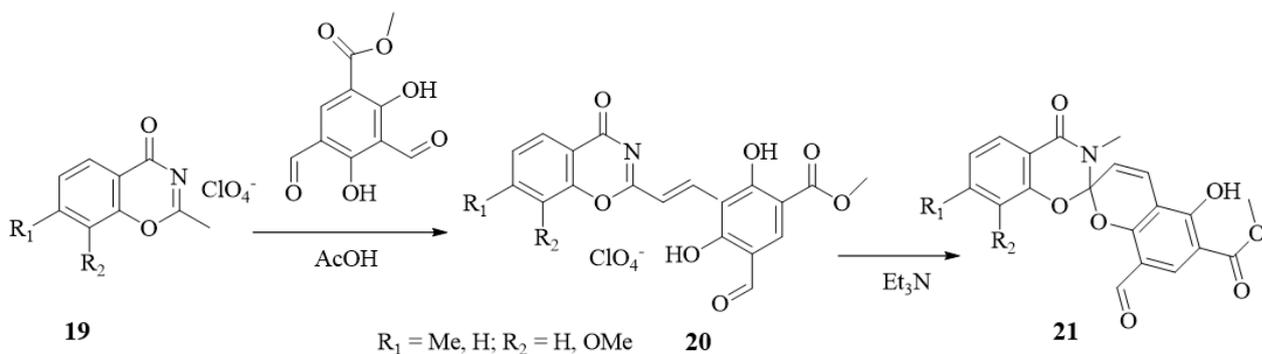


Рисунок 1.6. Синтеза спиропиранов **21**.

Авторы [12] получали изобензофурановый спиропиран **24** путем конденсации соли **22** с 2,4-дигидроксиизофталевым альдегидом. Полученный перхлорат 1-(2-оксистирил)-3,3-диметоксинафтилизобензофурилия **23** растворяли в гексане и обрабатывали газообразным NH_3 , получая спиропиран **24** (рис. 1.7).

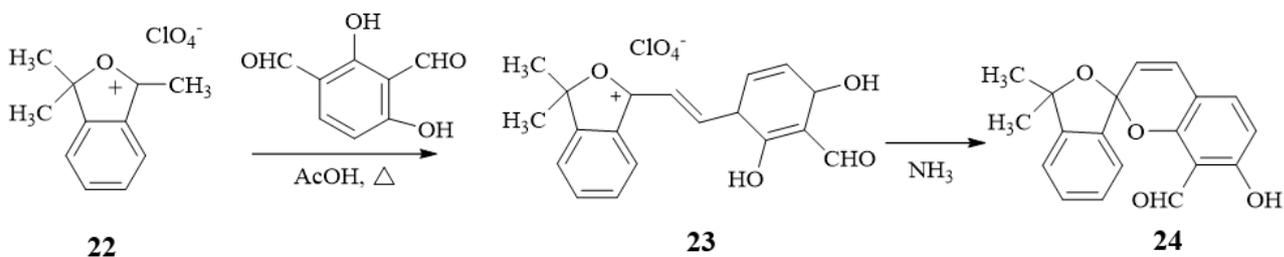


Рисунок 1.7. Синтез изобензофуранового спиропирана **24**.

Выбор третичных аминов для удаления элементов хлорной кислоты был основан на высокой реакционной способности бензоксазиниевого катиона по отношению к аммиаку, первичным и вторичным аминам.

Третий подход применяется в том случае, если сам спиропиран и его предшественники являются легко доступными, а спиропиран “выдерживает” соответствующие химические превращения [18, 40]. Галогенирование, нитрование VIPS и спиро(динафтопиранов) может проводиться по стандартным

методикам. Бромидная группа может быть заменен на циано-группу или атом лития; нитро-группа может быть восстановлена до амино группа и т. д. Все эти реакции невозможно проводить непосредственно с 5-формилсалицилальдегидом для получение соответствующих производных. Однако замещенный ВIPS может реагировать с 3,5-динитросалицилальдегидом с образованием 5-замещенного салицилальдегида [34].

Конденсация ВIPS или другого спиропирана с участием азотного гетероцикла обычно происходит быстро и плавно. В большинстве случаев гидроксильный альдегид и основание Фишера или четвертичная соль а также основание, например триэтиламин, кипятят с обратным холодильником в этаноле или изопропаноле, и относительно плохо растворимый спиропиран выпадает в осадок из реакционной смеси. Если спиропиран легко растворим в растворителях с низкой полярностью, вышеуказанные реагенты можно кипятить с обратным холодильником в гептане с азеотропным удалением образовавшейся воды, а соль триэтиламмония удаляется фильтрованием. Продукт, выделенный из гептана, может содержать значительные количества солей триэтиламмония, которые наблюдаются в спектре ЯМР.

Метиленовые основания большинства гетероциклов обычно димеризуются мгновенно при образовании, поэтому необходимо использовать четвертичные соли. Однако основания Фишера достаточно стабильны, поскольку мономеры, даже с относительно высокой молекулярной массой, такие как 1- или 3-фенильные соединения, можно перегонять. По существу, бесцветную основу всегда следует использовать сразу после перегонки для приготовления ВIPS; спиропиран будет получен в состоянии высокой чистоты после фильтрации. Если неочищенное основание Фишера невозможно перегнать или оно сильно загрязнено индолами и индоленинами после синтеза, образование спиропирана служит методом разделения. Обычно гидроксильный альдегид и основание Фишера или соответствующая четвертичная соль используются в эквимольных количествах.

Как правило, при синтезе спиропиранов этанол используется в качестве растворителя. Метилэтилкетон также является подходящим растворителем если промежуточный продукт содержит реакционно способную спиртовую группу, например, гидроиодид 1-(2-карбоксиитил) основания Фишера. В ароматических растворителях, таких как толуол, конденсация протекает хорошо, и образовавшуюся воду можно удалить азеотропной перегонкой.

Кристаллизацию спиропиранов следует проводить как можно быстрее, чтобы получить мелкие, легко промываемые кристаллы. Большинство простых ВIPS в чистом виде представляют собой твердые вещества, бесцветные или бледно-желтого цвета. Примеси грязно-бордового или красно-коричневого цвета указывают на окисленную форму основания Фишера. Перекристаллизацию 6-нитроВIPS и его простых (метокси, алкил, галоген) производных часто лучше всего проводить из чистого этилацетата с использованием активированного угля.

1.3 Свойства спиропиранов

1.3.1 Общие свойства

Первая упомянутая в литературе химическая характеристика спиропиранов, открытая в начале двадцатого века, представляет собой обратимое превращение в окрашенные формы. Такой переход может происходить при растворении в полярных растворителях (сольватохромизм), при нагревании (термохромизм) или под действием активирующего излучения (фотохромизм) [18, 36, 41]. Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в разделе 1.3.2. На основе анализа строения и фотохромных свойств индолиновых спиропиранов было показано, что их фотохромные характеристики обусловлены разрывом связи $C_{\text{spiro}}-O$ при фотовозбуждении. Эта связь удлиняется и ослабевает за счет орбитальных взаимодействий между неподеленной электронной парой индолинового азота и разрыхляющей орбиталью связи $C_{\text{spiro}}-O$. Общая схема таких превращений включает образование при разрыве связи $C_{\text{spiro}}-O$ [2H]хроменого фрагмента

биполярной структуры, который может переходить в хиноидную форму с другой конфигурацией полиметиновой цепи [7, 40, 42, 43]. Два изомера спиропирана (SP и MC) имеют разные кислотные свойства (рис. 1.8).

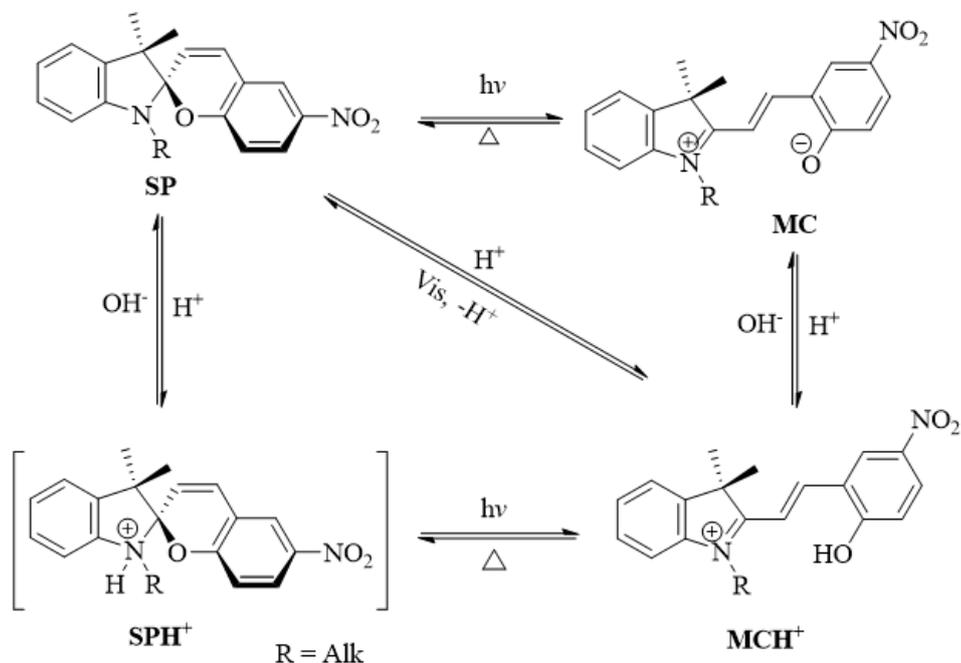


Рисунок 1.8. Обратимые превращения между четырьмя состояниями: спиропираном (SP), мероцианином (MC), протонированным мероцианином (MCH⁺) и протонированным спиропираном (SPH⁺).

При действии кислот на растворы спиропиранов раскрытие [2H]пиранового цикла может сопровождаться присоединением протона к фенолятному атому кислорода биполярной формы MCH⁺ [44-48]. Протонный обмен дает значительное изменение пика поглощения спиропирана (рис. 1.9).

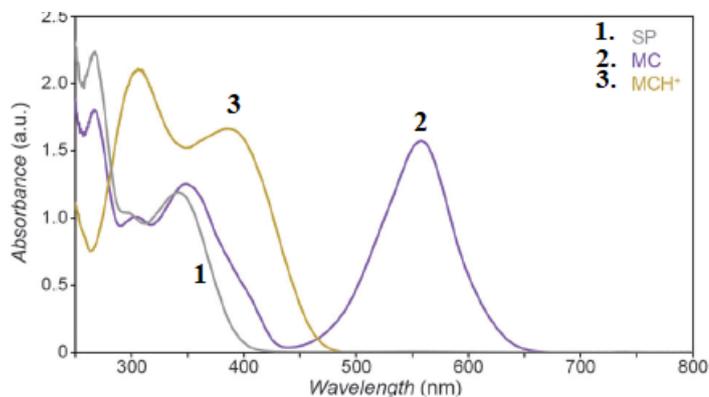


Рисунок 1.9. УФ-спектры поглощения спиропирана до (1) и после УФ-облучения (2), а также после добавления HCl (3) [7].

Циклические формы спиропиранов легко вступают в различные реакции замещения. Так, например, при бромировании 1,3,3-триметилспиро(индолин-2,2'-хромена) N-бромсукцинимидом в хлороформе бром входит в положение 5 индолинового фрагмента, а действие избытка N-бромсукцинимиды приводит к образованию 5,7,3',6'-тетрабромпроизводного. Использование в качестве галогенирующих агентов галогенидов двухвалентной меди в присутствии хлорида алюминия или комплексов трехфтористого бора приводит к образованию 5-галогенпроизводных. При действии брома в хлороформе на 5,6'-динитро-1,3,3-триметилспиро(индолин-2,2'-хромен) атом брома входит в положение 7 индолинового фрагмента с образованием 7-бромсодержащего 5,6'-динитро-1,3,3-триметилспиро(индолин-2,2'-хромена) **25**. Также существует возможность замены атома брома в положении 5 индолинового фрагмента на цианогруппу (рис. 1.10).

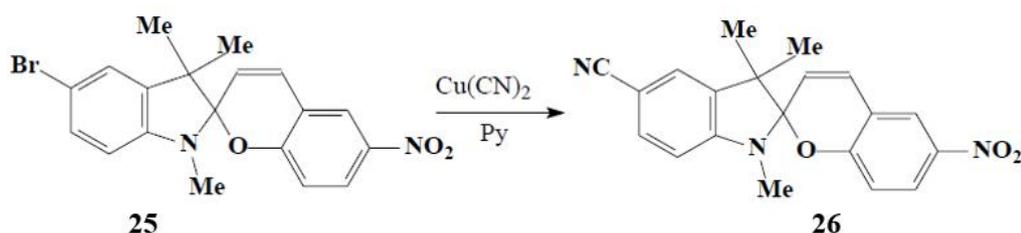


Рисунок 1.10. Реакция замещения спиропирана **25**.

При действии азотной кислоты в уксусном ангидриде на 6'-нитро-1,3,3-триметилспиро(индолин-2,2'-хромен) нитрогруппа входит в положение 5 индолинового фрагмента. Затем он может быть восстановлен молекулярным водородом на платиновом электроде до аминогруппы, которая легко ацилируется уксусным ангидридом [49].

При действии нитрита натрия на индолиноспиропираны в уксусной кислоте можно ввести нитросогруппу в положение 5 индолинового фрагмента, а при его окислении кислородом воздуха образуется соответствующее нитропроизводное [50]. Азосочетание солей фенилдиазония с индолиноспиропиранами происходит в положение 5 индолинового фрагмента, который отличается высокой реакционной способностью. Ацилирование

уксусным ангидридом в присутствии комплексов трифторида бора или бензоилхлорида в диметиланилине приводит к введению ацильной группы в положение 3' [51].

Возможно также ацилирование гидроксильной группы в N-(β-гидроксиэтил) производных индолиноспиропиранов и тиазолиноспиропиранов, хотя эта реакция сопровождается образованием побочных продуктов [30].

В случае 6'-нитро-1,3,3-триметилспиро(индолин-2,2'-[2H]хромена) **27** удалось выделить две соли с HCl, различающиеся физико-химическими характеристиками (рис. 1.11). В толуоле при -78 °С образуется желтоватая соль **28**, которая полностью превращается в изомер **29** при хранении или при кипячении в спирте в течение 10 минут [4].

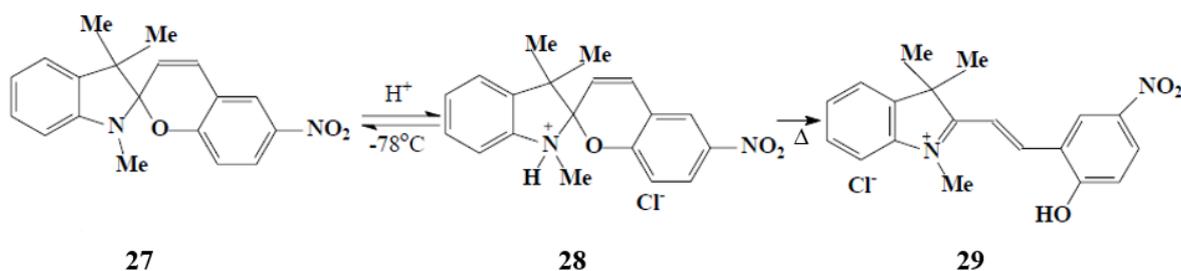


Рисунок 1.11. Реакция спиропирана с соляной кислотой.

В последнее время сообщалось о нескольких исследованиях способности спиропиранов образовывать комплексы с ионами металлов. Комплексообразование обычно стимулируется стабилизацией полярной МС-формы спиропирана (МС : M^{n+} = 2:1). Поскольку отрицательно заряженная фенолятная группа формы МС может служить центром комплексообразования, при введении соответствующего заместителя, включающего донорные атомы в непосредственной близости от фенолятной группы, спиропиран приобретает способность образовывать хелатные комплексы с ионами металлов [52]. В этом случае процесс комплексообразования и устойчивость комплексов может изменяться в зависимости от вариации природы донорных атомов и доступности координационного центра [53].

В настоящее время существует несколько механизмов, объясняющих комплексообразование спиропирана с ионами металлов. Кинетические исследования авторов [54] показывают, что комплексообразование спиропирана **30** с ионами металлов в растворе представляет собой результат двух связанных реакций: образования “открытой” формы МС **31** (рис. 1.12а) и координация иона металла этим лигандом (рис. 1.12б).

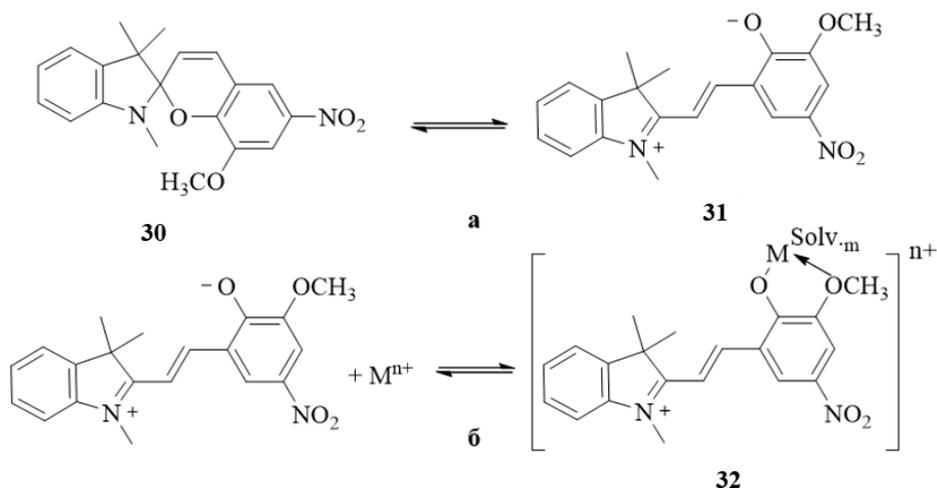


Рисунок 1.12. Комплексообразование спиропирана с ионами металлов (solv._m координированных растворителя на ионе металла).

В другом исследовании авторы также продемонстрировали, что спиропиран индолинового ряда **33** образует комплексы **35** с катионами металлов, которые, по-видимому, включают мероцианиновую форму МС **34** спиропирана (рис. 1.13) [55].

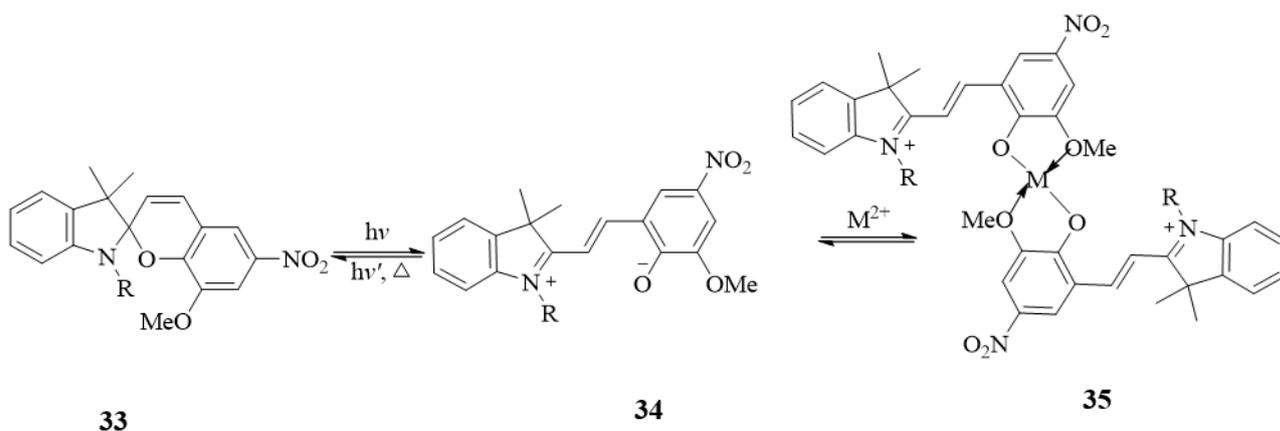


Рисунок 1.13. Комплексообразование спиропирана **33** с ионами металлов в исследовании [55].

Спиропиран **36** (на рис. 1.14), модифицированный циклическими молекулярными группами, такими как оксиметилкраун-эфир, показал свойства фотохромизма, индуцированного ионами металлов. Когда краунэфирная группа введена в 8'-положение бензопирановой части спиропирана, бесцветный изомер SP переходит в окрашенную форму MC, только в случае образования циклической группой комплекса **38** с катионом Li^+ [56].

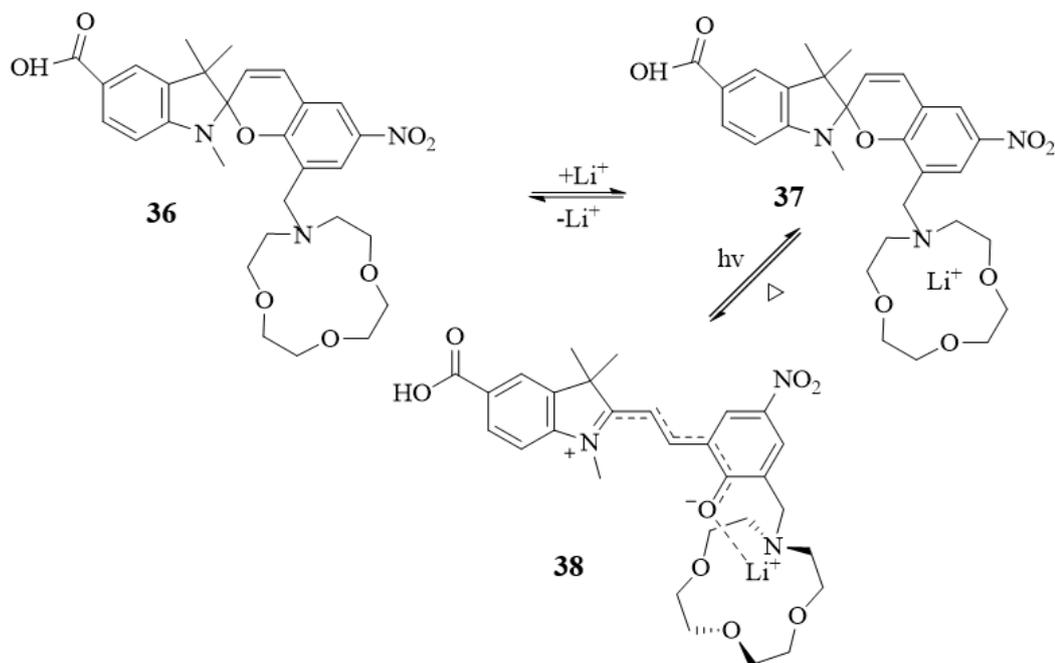


Рисунок 1.14. Модель связывания ионов лития и ионно-индуцированного переключения спиропирана **36**.

Имеются данные о люминесценции комплексов спиропиранов с переходными металлами и редкоземельными элементами; комплексообразование с ионами La, Y, Er и других редкоземельных металлов приводит к сильному увеличению интенсивности люминесценции с одновременным сдвигом максимума люминесценции в коротковолновую область. “Открытая” мероцианиновая форма спиропирана образует металлокомплексы, обладающие характерными спектрами поглощения, и представляет интерес для разработки методов определения металлов, основанных на цветных реакциях.

Известны также комплексы *бис*-спиропиранов, и их комплексообразующая способность изучена в сравнении с моноспиропиранами [57, 58]. Установлено, что комплексы *бис*-спиропиранов обладают более высокой фотохимической активностью, чем моноспиропираны. В статье [59] гидразоны **40**, используемые в качестве лигандов для синтеза биядерных комплексов меди **41** и **42**, были получены на основе спиропирана **39**, содержащего *орто*-расположенные гидроксильные и формильные группы в бензольном кольце [2Н] хроменого фрагмента.

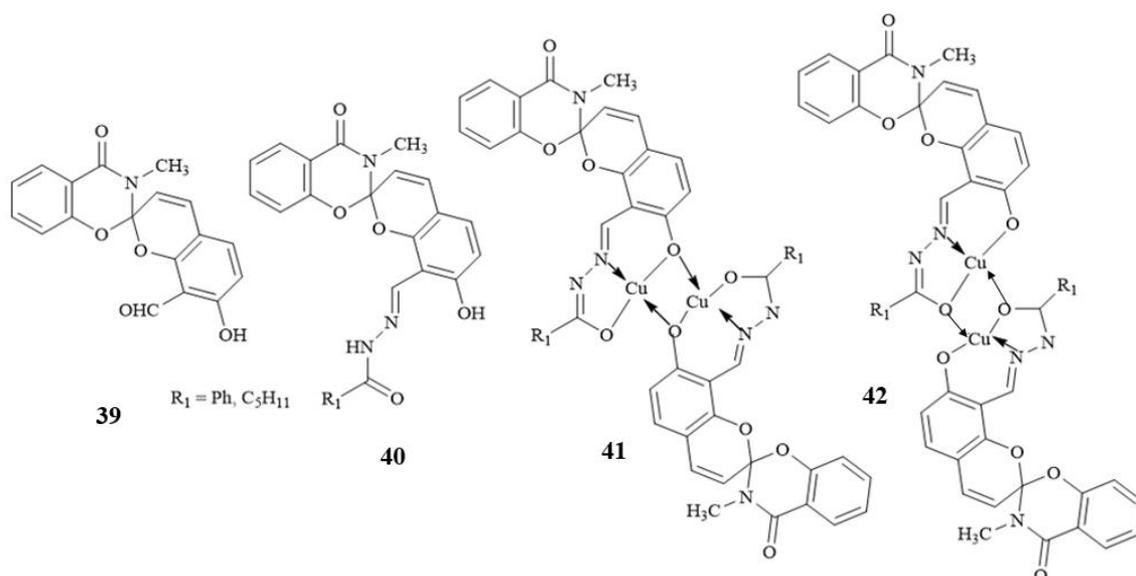


Рисунок 1.15. Комплексы *бис*-спиропиранов **41** и **42**.

Таким образом, на основе свойств спиропиранов получение производных спиропиранов и их комплексных соединений является важным направлением исследований с целью разработки новых фоточувствительных соединений, а также создания потенциально фотохромных материалов с прогнозируемыми свойствами.

1.3.2 Фотохромные свойства спиропиранов

Фотохромизм - это явление обратимого изменения пространственного и электронного строения молекул под действием света, сопровождающееся изменением окраски вещества. На рис. 1.16 показано, что термодинамически стабильная форма **SP** при облучении превращается в форму **MC** [34, 60-62].

Обратная реакция может протекать термически (фотохромизм типа Т) или фотохимически (фотохромизм типа Р).

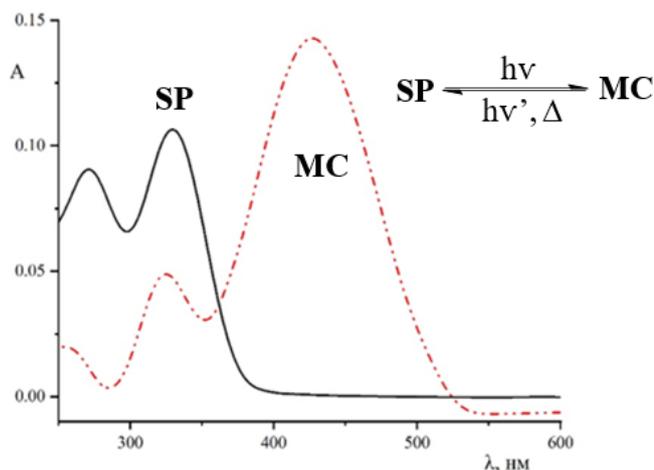


Рисунок 1.16. Различие в спектрах поглощения между двумя изомерными формами фотохромных частиц.

Спиропираны – наиболее распространенный класс органических фотохромов. На основе анализа строения и фотохромных характеристик индолиновых спиропиранов было показано, что их фотохромные характеристики, обусловленные электроциклическим разрывом связи $C_{\text{spiro}}-O$ при фотовозбуждении, во многом предопределены уже тем, что в основном состоянии эта связь удлиняется и ослабевает за счет орбитальных взаимодействий между неподеленной электронной парой индолинового азота и разрыхляющей орбиталью связи $C_{\text{spiro}}-O$ [63]. Связь $C_{\text{spiro}}-O$ разрывается, образуя промежуточную форму с раскрытым кольцом, с последующей изомеризацией в равновесную форму MC. Характерное поглощение промежуточной формы наблюдается в области 430–450 нм; время его жизни в растворе составляет от 10^{-8} до 10^{-3} с [64, 65]. Авторы [66] изучали кривую потенциальной энергии основного и возбужденного состояний спиропиранов, пытаясь объяснить механизмы фотохимических превращений. Сообщается, что в реакции фотоизомеризации спиропиранов участвует не только синглетное, но и триплетное состояние. В реакции фотоизомеризации участие синглетного и

триплетного состояний существенно зависит от характеристик молекулярного скелета, положения и свойств заместителей в кольцах.

На спектре поглощения “закрытых” SP форм спиропиранов факторы окружающей среды (включая температуру, концентрацию, растворитель и т. д.) влияют в малой степени, в то время как “открытые” MC формы очень к ним чувствительны. Обычно при понижении температуры интенсивность поглощения длинноволновой полосы MC формы снижается и, соответственно, увеличивается интенсивность поглощения коротковолновой полосы. По мере увеличения полярности растворителя пики поглощения в видимом диапазоне света смещаются bathochromно, коэффициент экстинкции уменьшается, при этом пики одновременно уширяются. По вышеуказанному поведению можно определить, что доминирующей структурой форм с раскрытым кольцом является цвиттер-ионная форма [21].

Теоретические исследования влияния заместителей на спектральные характеристики фотоиндуцированных форм позволили найти ряд соединений с сильным bathochromным сдвигом длинноволновой полосы в мероцианиновом MC изомере. Это достигается в первую очередь введением π -акцепторных заместителей, таких как, например, нитро-группа, в бензольное кольцо хроменовой части спиропиранов [68]. В случае индолиновых спиропиранов было показано, что введение в молекулу π -акцепторных заместителей, отличных от нитрогруппы, дает значительный bathochromный сдвиг полосы поглощения фотоиндуцированной формы. Значительный bathochromный сдвиг длинноволновой полосы поглощения фотоиндуцированных форм спиропиранов достигается также заменой атома кислорода на атом серы в пирановом фрагменте молекулы; положение максимума полосы поглощения λ_{max} окрашенных форм 6'-нитро-1,3,3-триметилиндолиноспиропирана составляет 532 нм [63]. Особый случай представляют спиропираны с линейно аннелированными кольцами (6,7-бензаннелирование в хроменовой части). Как показали квантово-химические расчеты, в таких системах длинноволновый

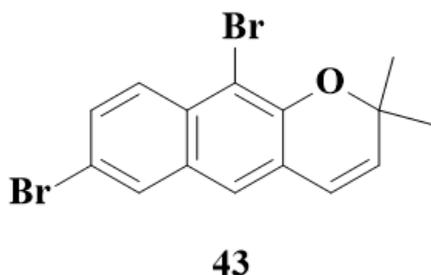


Рисунок 1.17. Модельный [2H]хромен **43**.

максимум полосы поглощения фотоиндуцированной формы должен наблюдаться в области 750 нм [69]. Однако у спиропирана 2-оксазолидинового ряда длинноволновая полоса поглощения в спектре фотоиндуцированной формы наблюдается экспериментально при 461 нм [70].

Поскольку фотохромные характеристики спиропиранов обусловлены раскрытием бензопиранового цикла, для исключения предполагаемого влияния гетаренового фрагмента на спектр окрашенной формы был синтезирован модельный [2H]хромен **43** [70]. Однако, длинноволновая полоса поглощения его фотоиндуцированной формы наблюдается при 425 нм, что также не согласуется с расчетной длиной волны (539 нм) [71].

Сильный фотохромизм отмечается для *бис*-индолиноспиробензопиранов типа **44** (рис. 1.18) [72].

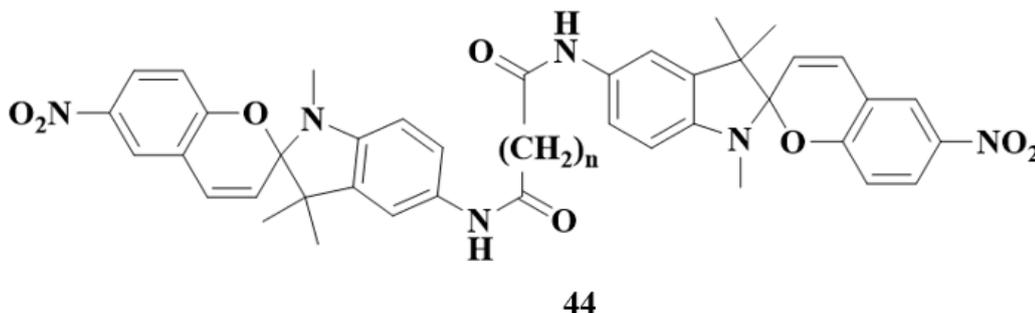


Рисунок 1.18. *Бис*-индолиноспиробензопираны.

Включение спиропиранов в гибридные материалы в последние годы привлекает все больший интерес из-за их выдающихся фотохромных и сольватохромных реакций. Авторы [22] исследовали инфракрасную спектроскопическую характеристику и фотостабильность 1,3,3-триметилиндолино-6'-нитробензопирилоспирана **45** (рис. 1.19), присоединенного к различным кристаллическим нанопористым MOF

(металлоорганический каркас). Известно, что эти гибридные материалы допускают фотопереключение в твердом состоянии. Было обнаружено, что МС форма **46** (*транс-транс-цис*) генерируется под воздействием УФ-излучения внутри различных хозяев MOF.

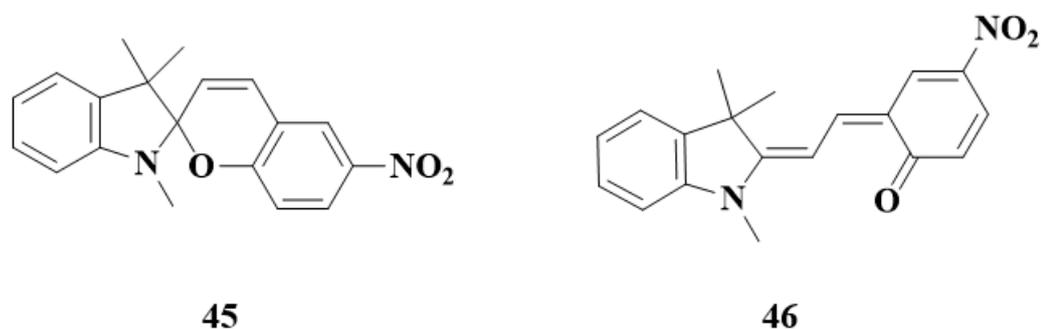


Рисунок 1.19. Spiропираны и *транс-транс-цис* изомер в исследованиях [22].

Авторы [24] квантово-химическими методами исследовали молекулярные орбитали Spiропирана **45** в гибридных соединениях с фуллереном. Были получены траектории различных путей фото- и термоизомеризации Spiрана **45** и его *транс-транс-цис*-мероцианиновой формой и исследована роль $\pi\pi^*$ -состояний вдоль соответствующих поверхностей потенциальной энергии (ППЭ). Недиссоциативные состояния $\pi\pi^*$ на траекториях могут переходить в диссоциативное фотоактивное состояние $\pi\pi^*$ при двух пересечениях их ППЭ.

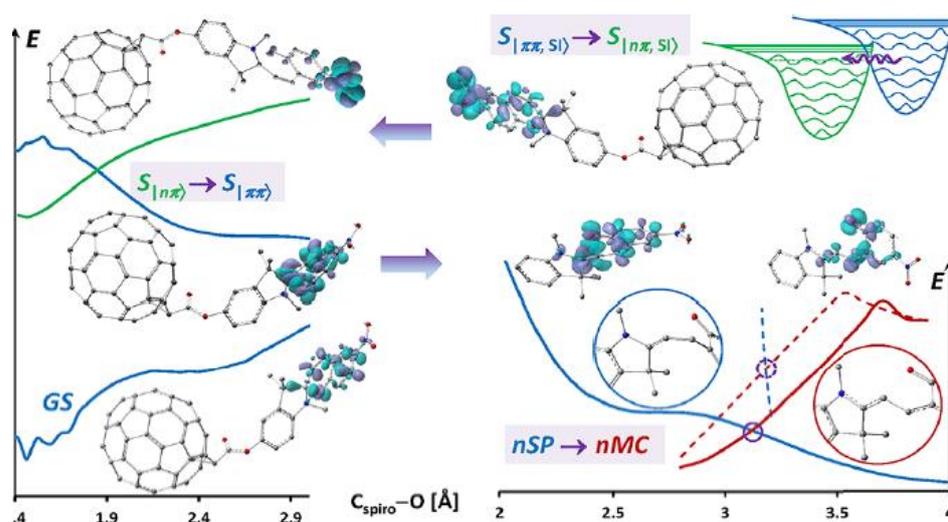


Рисунок 1.20. Траектории фотопревращения 1,3,3-триметилиндолино-6'-нитробензопирилоспирана **45** в гибридных соединениях с фуллереном [24].

Фотохромные свойства, унаследованные гибридными соединениями нитроспиропиран содержащего фуллерена, интерпретируются как обратимый механизм $пл^* \leftrightarrow пл^*$ как при адиабатическом переходе, так и в неадиабатических диссипативных переходах между возбужденными состояниями фотохромного фрагмента, что предотвращает потерю энергии через фуллерен и, таким образом, сохраняет фотохромные свойства в неизменном виде.

1.4 Применение спиропиранов

1.4.1 Приложения в оптических устройствах

Благодаря превосходным фотохромным свойствам спиропиранов были разработаны различные подходы к созданию многофункциональных материалов на их основе. Практическое применение фотохромизма вначале (около 1955 г.) было сосредоточено на спиропиранах, и особенно на соединениях типа BIPS, из-за их доступности, светочувствительности, удобных скоростей теплового затухания и хорошего цветового контраста при восприятии человеческим глазом. Однако для приложений, в которых оптические красители должны претерпевать многократные фотохромные циклы (например, в качестве оптических переключателей в фотохромных носителях информации для компьютера) [73] или подвергаться непрерывному облучению (например, в солнцезащитных очках, лобовых стеклах транспортных средств), данные соединения были непрактичными из-за быстрой фотодеградации [74-77]. Более устойчивыми к фотодеградации оказались спиронафтоксазины [78]. В последнее время для использования в солнцезащитных очках спирооксазины вытесняются 2,2-дизамещенными пиранами, которые заменяют спиропираны в нескольких областях применения из-за их еще большей устойчивости к фотодеградации.

В настоящее время спиропираны имеют ограниченное применение в качестве индикаторов воздействия на фотолитографических пластинах, для записи микроизображений, а также визуализации потока жидкости. Для этих целей фотодеградация не является существенным ограничением. Кроме того,

спиропираны могут применяться в типографских красках для футболок и игрушек с ограниченным сроком службы.

В исследовании [79] было показано, что палладиевые наноконтейнеры соответствуют форме *E*-мероцианина и применяются в качестве активного компонента невидимых чернил. При письме гексановым раствором спиропирана **SP2** на бумаге, смоченной раствором **MB2** (молекулярный бочонок палладиевые на основе тетраимидазола), такие чернила не оставляют следов. Последующее УФ-облучение приводит к превращению “закрытую” форму **SP2** в “открытую” форму **MC2**, который сразу же инкапсулируется **MB2**, проявляя надпись, которую можно стереть промывкой дихлорметаном (рис. 1.21).

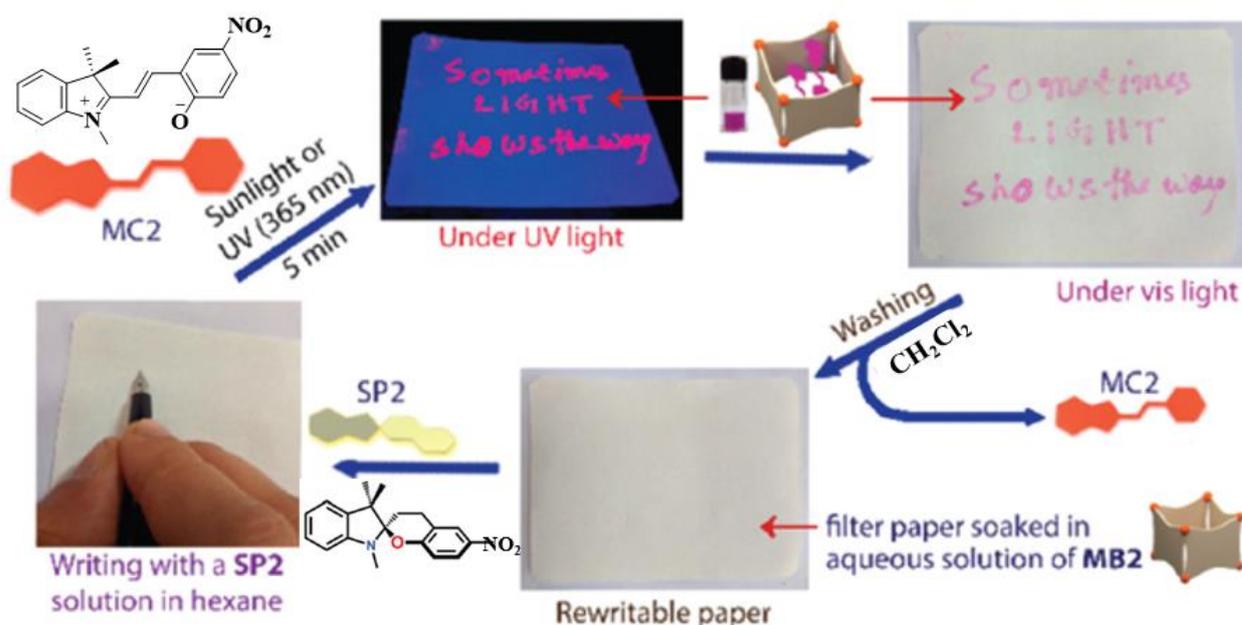


Рисунок 1.21. Прикладные исследования оптических свойств спиропирана описаны в исследованиях [79] и [44].

Одна из тенденций последних лет заключается в отказе от использования фотохромных веществ как индивидуального компонента раствора, полимерной пленки или объемной полимерной матрицы. Вместо этого молекулу фотохромного вещества химически связывают с полимером, в том числе природным, таким как производные целлюлозы, ферменты, белки или синтетические полимеры из акрилатов, уретанов и виниловых соединений. Свойства полимера затем можно изменять внешним облучением [21, 80, 81].

1.4.2 Аналитическое применение спиропиранов

1.4.2.1 Обнаружение ионов металлов

Из двух изомерных форм (SP и MC), только форма мероцианиновая MC форма является флуоресцирующей, и большинство её ионных комплексов также проявляют флуоресцентные свойства. Отслеживая изменения оптических спектров спиропиранов после комплексообразования с ионами металлов, можно проводить обнаружение ионов металлов спектрофотометрическим или флуорометрическим методом [38, 82-84]. Еще одна причина, которая делает спиропираны привлекательным материалом, заключается в том, что его можно использовать в качестве регенерируемой системы обнаружения изомерных превращений комплексов ионов металлов с формой MC обратно в исходную “закрытую” SP форму посредством воздействия видимым светом. Кроме того, спиропираны могут быть дополнительно функционализированы для улучшения возможности комплексообразования.

Путем введения дополнительного рецептора в 8'-положение бензопирановой части спиропирана индолинового, были разработаны несколько интересных колориметрических и флуорометрических хемосенсоров на ионы Zn^{2+} .

Селективное обнаружение Zn^{2+} с высокой чувствительностью было выполнено с использованием материала на основе спиропирана **47**, в котором три донорных центра объединены с имеющейся ОН группой [85]. В частности, 2-амино-N-(хинол-8-ил)ацетамид **49**, обладающий тремя азотсодержащими донорными центрами, использовали в качестве платформы, способствующей связыванию ионов цинка (рис. 1.22). Эти донорные атомы формируют «координационную полость» для размещения Zn^{2+} когда спиропиран находится в форме MC. В результате, за счет образования жесткого комплекса **51** с участием ближайших азотных лигандов, было достигнуто 16-кратное увеличение сигнала флуоресценции в присутствии ионов Zn^{2+} . Скрининговые

тесты показали, что при добавлении ионов металлов, только ионы Cu^{2+} и Zn^{2+} переводили бесцветный зонд в красный цвет в водном растворе этанола.

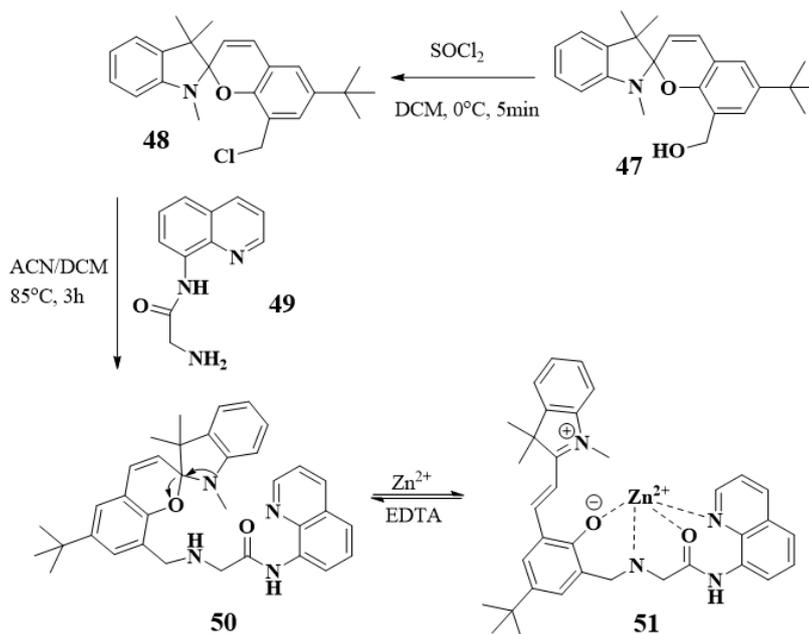


Рисунок 1.22. Комплекс спиropyрана **47** с ионами Zn^{2+} .

Ион Cu^{2+} обладает высоким сродством к производными спиropyрана. Колориметрический датчик, специфичный по отношению к Cu^{2+} , содержащий нафталин-1,8-диольный фрагмент, превращался в “открытую” форму **53** и **54** за счет образования внутримолекулярной водородной связи в шестичленном кольце (рис. 1.23) [86]. При добавлении ионов Cu^{2+} в фосфатно-буферный физиологический раствор, появляется новая полоса в спектрах поглощения спиropyрана **52**.

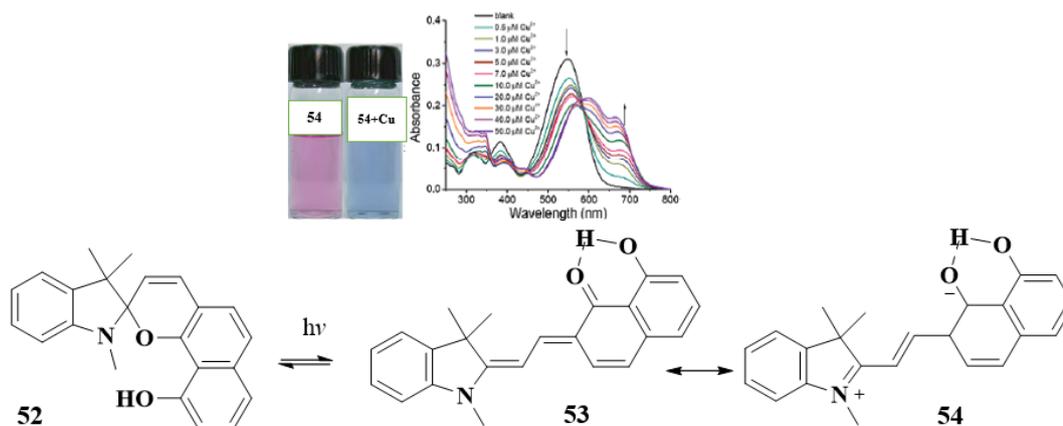


Рисунок 1.23. Колориметрический датчик **54**, специфичный для Cu^{2+} , стабилизированный внутримолекулярной водородной связью.

Повышенная чувствительность к ионам Cu^{2+} может быть получена путем введения 1,2,3-триазола в качестве дополнительного координационного узла (рис. 1.24) [87].

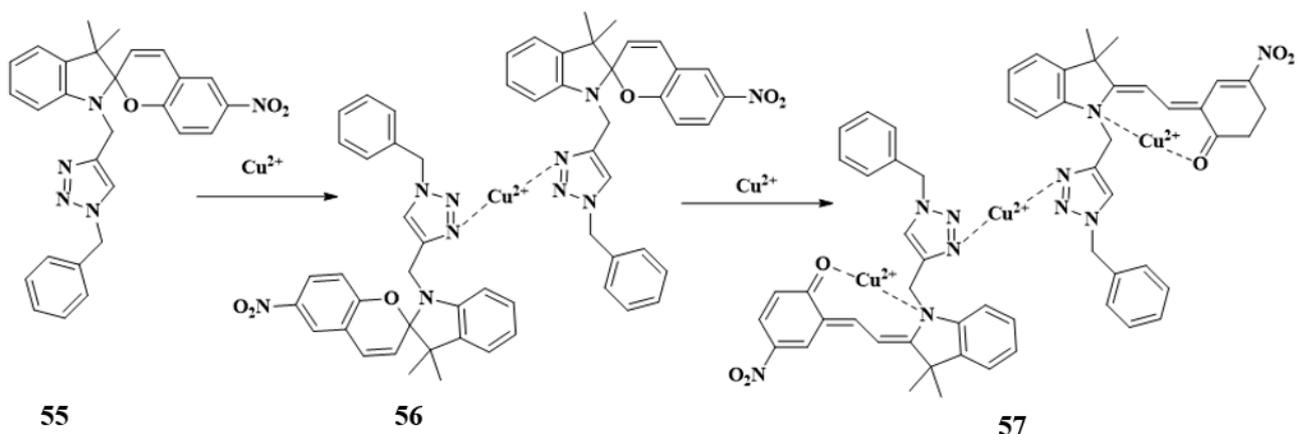


Рисунок 1.24. Предлагаемый механизм связывания в комплексе Cu^{2+} со спиропираном **55**.

На первом этапе катион металла связывал два 1,2,3-триазольных (спиропирана **55**) звена вместе, что запускало активацию связи С–О другим катионом металла и последующее раскрытие кольца. Это приводило к комплексообразованию **57** Cu^{2+} и 1,2,3-триазольного узла в соотношении 3:2. Что еще более важно, максимальная интенсивность пика поглощения постепенно увеличивалась с повышением концентрации ионов Cu^{2+} , что указывает на то, что интенсивность пика может использоваться для количественной оценки концентрации Cu^{2+} . Кроме того, спиропираны замещенные по индольному атому азота алкильной цепочкой с какой-либо концевой группой, такой как карбоксильная, эфирная и гидроксигруппа, показали примечательную реакцию на присутствие Cu^{2+} обнаруженную методом электронной спектроскопии [88]. Это указывает на то, что основные заместители спиропирана являются ключом к достижению хорошей селективности в отношении определенного аналита, такого как ионы Cu^{2+} .

Новый зонд для колориметрического и флуоресцентного радиометрического обнаружения Cu^{2+} был разработан Шао [89]. Этот спиропиран **58** содержит функциональную группу морфолина в 8'-положении и

демонстрирует резкое изменение цвета при образовании комплекса с Cu^{2+} (рис. 1.25). Примечательно, что “закрытая” форма зонда обладала заметной флуоресценцией и показала снижение интенсивности исходной полосы излучения флуоресценции при комплексообразовании **59** с ионами Cu^{2+} . Следовательно, морфолин, содержащий спиропиран, может использоваться для качественного обнаружения (колориметрического) и даже количественного (флуоресцентного) определения концентрации ионов Cu^{2+} .

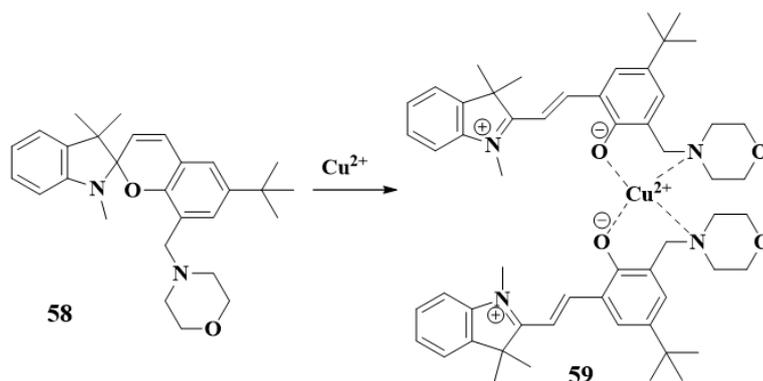


Рисунок 1.25. Схема комплексообразования спиропирана **58** с ионом Cu^{2+} .

Кроме того, были разработаны колориметрические и флуоресцентные хемосенсоры на основе производных спиропирана с добавлением изохинолина **60** для обнаружения токсичных ионов тяжелых металлов, таких как Co^{2+} и In^{3+} [90]. В отличие от других спиропиранов, которые переходят в “открытую” форму под воздействием УФ-излучения, производные изохинолина могут изомеризоваться в темноте без УФ-излучения (рис. 1.26).

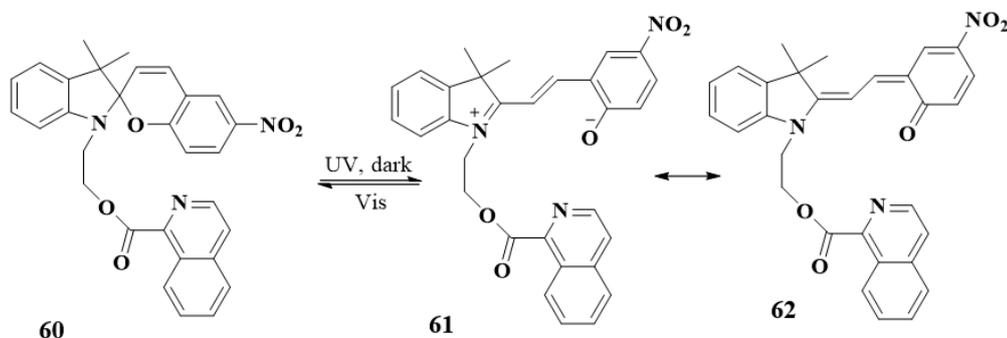


Рисунок 1.26. Преобразование между “закрытыми” (**60**) и “открытыми” (**61** и **62**) формами спиропирана.

В то же время можно вызвать обратную реакцию воздействием видимого света. При УФ-облучении в присутствии ионов Co^{2+} , раствор розового цвета с розовой флуоресценцией наблюдался за счет образования спиропиранового комплекса Co^{2+} . В случае ионов In^{3+} , бесцветные формы **60** превращались в комплекс In^{3+} желтого цвета и розовой флуоресценцией. Таким образом, спиропиран **60** можно использовать для одновременного чувствительного обнаружения двух токсичных ионов металлов.

Другая интересная структура с одним или двумя спиропирановыми звеньями, включенными в кольцевой каркас краун-эфира, описана в исследовании [91] (рис. 1.27).

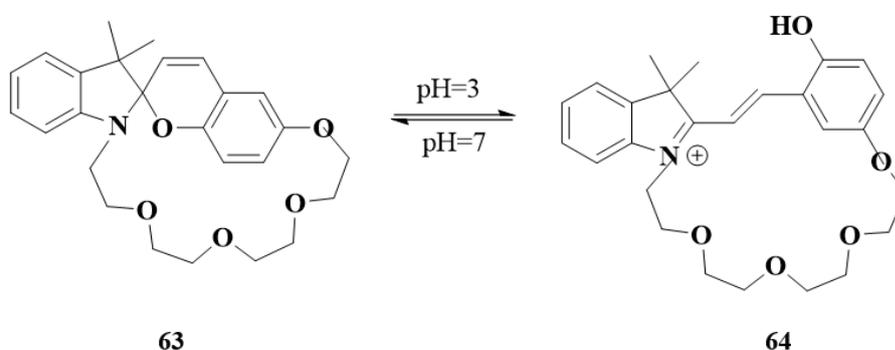


Рисунок 1.27. Структура спиропиранов изучаемых в [91].

Производное с одним спиропирановым звеном **63** в каркасе краун-эфира не показало фотохромных свойств из-за слабого акцептирования электронов б-эфирной группы. В этом случае форму SP **63** можно было бы переключить на “открытую” форму MC **64** путем понижения pH раствора. Это исследование предполагает, что свойства комплексообразования металлов можно регулировать, вызывая изменения размеров и заряда кольцевого каркаса спиропирана через изомеризацию.

Интересно отметить, что спиропиран **65**, функционализированный бутановой кислотой по индольному атому азота, описанный как колориметрический сенсор ионов Cu^{2+} в работе [88], также оказался эффективным флуоресцентный хемосенсор на ионы Mg^{2+} (рис. 1.28) [92].

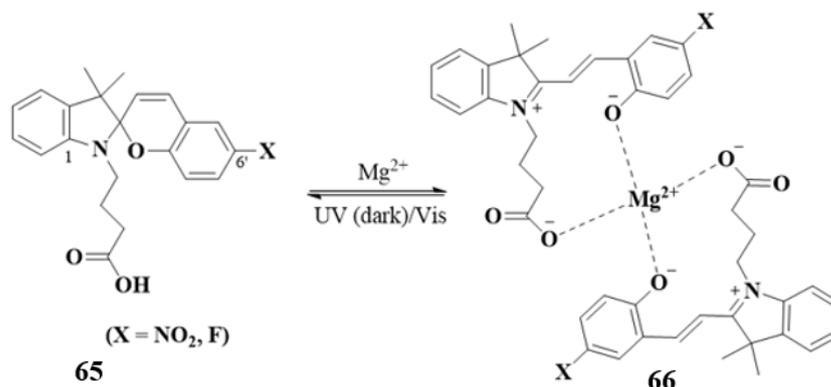


Рисунок 1.28. Комплексообразование спиропирана **65** с ионами Mg²⁺.

Хотя спектр поглощения этого производного спиропирана не изменялся при образовании комплекса с ионами Mg²⁺, интенсивность флуоресценции значительно увеличивается в присутствии Mg²⁺. Для дальнейшей разработки датчика на ионы Mg²⁺, спиропиран **65** был включен в микроструктурированное оптическое волокно. Эта комбинация привела к значительному улучшению отношения сигнал/шум при низких концентрациях ионов Mg²⁺.

Спиропираны также использовались для обнаружения ионов Ca²⁺ с повышенной чувствительностью. В статье [93] описывается новый зонд **67**, функционализированный циано- и карбоксильными группами для обнаружения Ca²⁺ за счет появления флуоресценции. Акцепторные свойства цианогруппы ослабляют связь С–О и способствуют изомеризации формы SP, в то время как атом кислорода в фенольной группе и карбонильная группа образующегося лиганда MC (**68** и **69**) связываются с ионом Ca²⁺ (рис. 1.29).

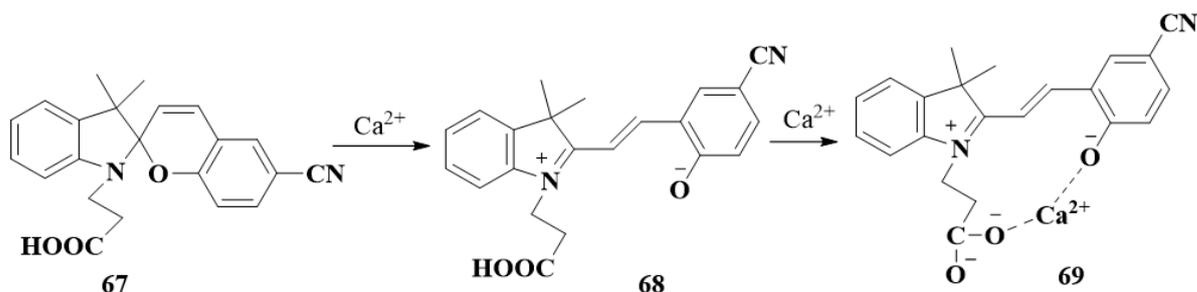


Рисунок 1.29. Изомеризация производных спиропирана **67** между формами SP и MC при комплексообразовании.

Образование МС- Ca^{2+} комплекса **71** подтверждается появлением новой полосы излучения с максимумом 604 нм. Благодаря такому подходу был достигнут предел обнаружения 45 нмоль/л, что указывает на ключевую роль циано- и карбоксильной групп при обнаружении Ca^{2+} . Кроме того, Хэнгом и его коллегами были синтезированы три спиропирана, способные обнаруживать ионы Ca^{2+} в клеточных лизатах [94]. В своей структуре металлохелаты связаны через положения R^2 и C^8 . В частности, спиропиран **70** содержал 1-аза-18-фрагмент краун-6 в 8'-положении бензопиранового кольца, в то время как положение R^2 было функционализировано метильным, гидроксипропиловым или гидроксипропиловым заместителем (рис. 1.30).

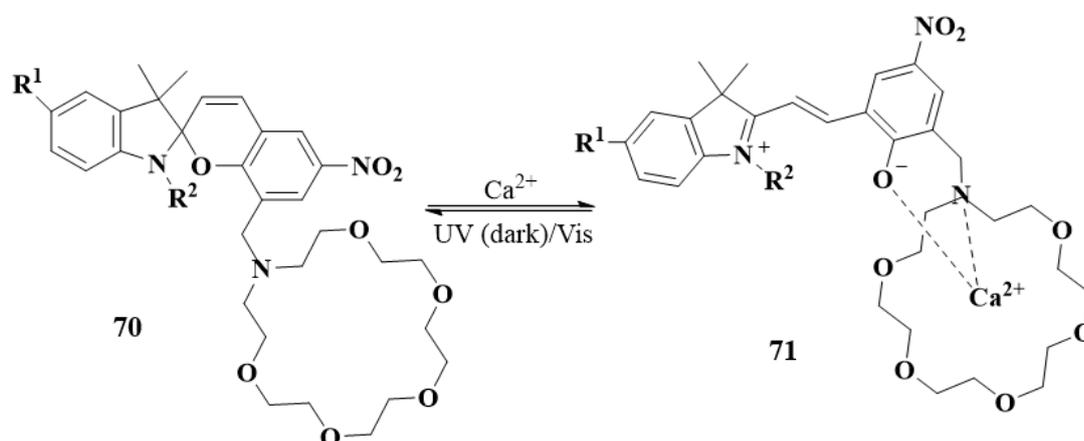


Рисунок 1.30. Комплексообразование спиропирана **70** с ионами Ca^{2+} .

Образование комплекса МС- Ca^{2+} **71** приводило к увеличению поглощения при 520–540 нм, что также сопровождается сильной флуоресценцией, красного цвета. Последующий анализ с использованием клеточной системы *in vitro* показали, что флуоресценция пропорциональна количеству Ca^{2+} , высвобождаемого из клетки НЕК293 при стимуляции иономицином. Это открывает возможность биологического применения спиропирана.

Спиропиран также использовался для обнаружения некоторых ионов тяжелых металлов в водных растворах. Так были разработаны бензотиазолиновые производные спиропираны, образующие комплексы с ионом Hg^{2+} [95]. Для связывания ионов Hg^{2+} , спиропиран был

функционализован метокси-группой в *орто*-положении к фенольному кислороду. Полученный спиропиран позволяет обнаруживать присутствие ионов Hg^{2+} за счет гипсохромного сдвига полос в спектрах поглощения и эмиссии. При образовании комплекса наблюдается изменение цвета раствора от темно-желтого до бесцветного. Таким образом, возможно использование данного соединения в качестве хемосенсора для мониторинга присутствия ионов ртути в биологических образцах и образцах окружающей среды с помощью колориметрических методов.

Наконец, было разработано производное спиропирана для использования в качестве светочувствительного оптода для захвата и высвобождения ионов Ca^{2+} и Na^+ [96]. Оптод использовал свет для повышения pK_a системы для изомеризации формы SP в MC. Изменение pH активировало спиропирановый фрагмент и стимулировало обмен протонами между аналитом и раствором индикатора. Точно так же были разработаны фотопереключаемые наносферы, содержащие спиропиран для поглощения и высвобождения ионов K^+ [95]. И снова ультрафиолетовый свет использовался для преобразования формы SP в MC, что вызывало вытеснение ионов K^+ из наносфер за счет протонирования формы MC. При облучении видимым светом, форма MC переходила обратно в SP форму, что вновь позволило наносферам поглощать ионы K^+ . Обнаружение Al^{3+} проводилось путем хелатирования ионов Al^{3+} системой, состоящей из родамина-спиропирана и спиропирана, содержащего метилпиридинильную группу у индольного атома азота [97, 98].

1.4.2.2 Обнаружение анионов

Таким же образом можно обнаруживать и анионы путем модификации и добавления функциональных групп спиропиранам. Ионы CN^- могут быть обнаружены при использовании структур, сочетающей фрагменты цинкового комплекса порфирина и спиропирана **72** (ZnP-SP) [99]. Цвет раствора, содержащего диады ZnP-SP меняется с красного на зеленый в присутствии анионов CN^- . Это красное смещение происходит в результате

комплексообразования **73** $\text{CN}^- \cdots \text{ZnP-SP}$ путем координации аниона CN^- на катион цинка фрагмента ZnP (рис. 1.31).

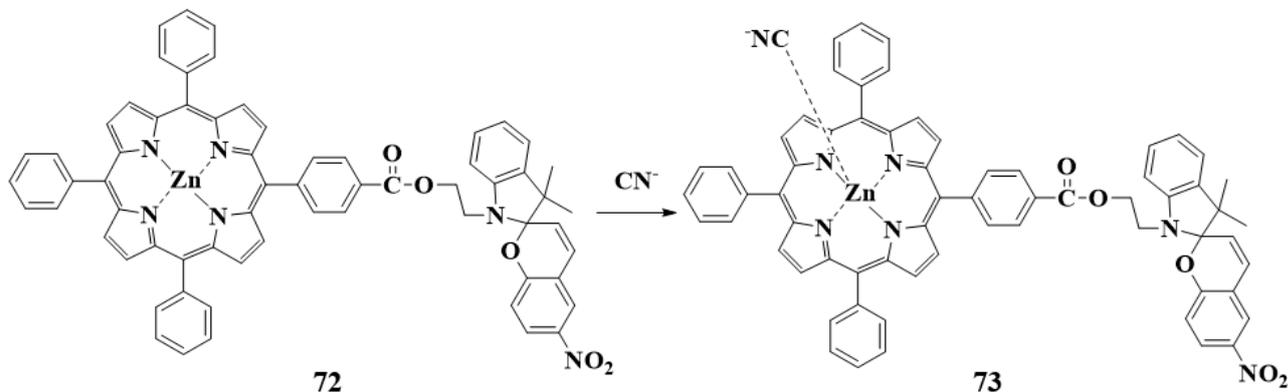


Рисунок 1.31. Предлагаемый механизм взаимодействия между ZnP-SP и анионом CN^- .

В статье [100] вводили 6-нитроBIPS в полидиациетиленовые липосомные системы для повышения растворимости в воде и чувствительности соединения. Изменение цвета полидиациетилена с синего на красный может быть вызвано реакцией нуклеофильного присоединения CN^- со спиропирановыми звеньями на поверхности липид-раствор. В данном случае спектрально детектируемые изменения полидиациетилена доминируют над таковыми для спиропирана, что позволяет селективно обнаруживать анион CN^- . Совсем недавно ученые из Индии [101] разработали систему фотопереключения на основе спиропирана - политиофен для обнаружения анионов CN^- . В этом исследовании эмиссия политиофенового фрагмента резко подавлялась, когда спиропиран существовал в “открытой” форме (MC) из-за резонансного переноса энергии флуоресценции из возбужденного состояния флуорофора, присоединенного к спиропирану. При облучении видимым светом происходила изомеризация MC в форму SP, приводящая к восстановлению флуоресценции. Однако в присутствии анионов CN^- , форма MC не способна тушить флуоресценцию, испускаемую политиофеном. Следовательно, система спиропиран-политиофен позволяет обнаруживать анионы CN^- .

1.4.2.3 Обнаружение кислот, растворителей и паров

Два изомерных состояния спиропирана обладают разными кислотными свойствами. При преобразовании формы SP в MC значение рКа изменяется на более чем 6 единиц. Протонирование формы MC через фенолятную группу приводит к образованию протонированной формы MCH⁺ (рис. 1.32).

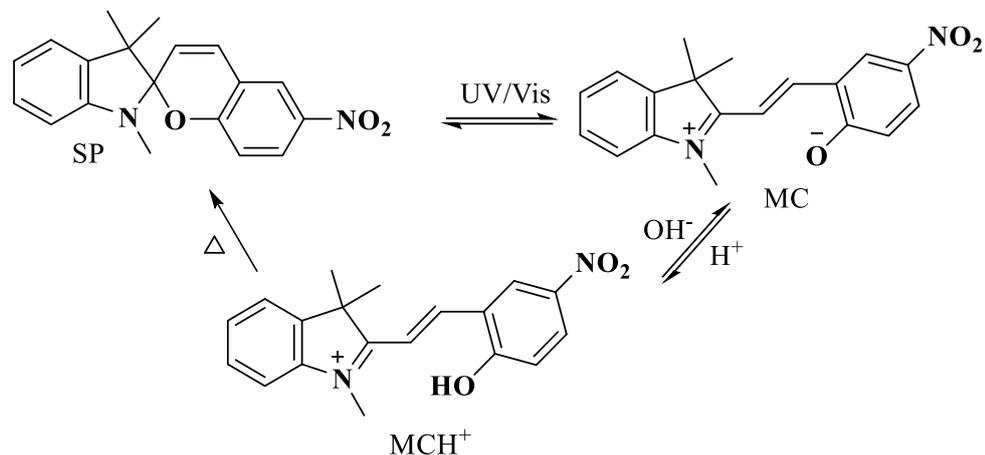


Рисунок 1.32. Протонирование изомеров спиропирана.

Протонирование может сопровождаться сдвигом максимума поглощения в более коротковолновую область по сравнению с формой MC. Более того, даже в протонированном состоянии под влиянием температуры может происходить обратный процесс с образованием SP-изомеров, который ускоряется при облучении видимым светом или обработке основанием. Воспользовавшись этими свойствами, исследователи разработали целый ряд эффективных фотопереклюателей, регулирующих pH [102], позволяющих управлять протонами, процессами передачи для различных применений. Кроме того, спиропиран также обладает сольватохромными свойствами из-за разной полярности и гидрофобности изоформ SP и MC. Это позволяет оптически определять растворители или изменения свойств растворителя.

В другом исследовании, 6-нитроBIPS и его производное, несущие гидроксиэтильную группу на индольном атоме азота, вводили в полидиметилсилоксановую пленку для изготовления светочувствительных и многоразовых датчиков паров кислоты. В обоих случаях пленка полидиметилсилоксана со спиропираном являлась фиолетовой при

воздействии УФ-света и становилась бесцветной при воздействии видимого света [103, 104].

Помимо света, ионов и рН, обратимая изомеризация спиропирана также может быть запущена растворителем, в котором растворен спиропиран. Было продемонстрировано, что 6-нитроВIPS является бесцветным в темноте при растворении в неполярных растворителях, таких как гексан и петролейный эфир, но окрашивается при облучении раствора УФ-излучением [105]. Напротив, растворы 6-нитроВIPS в полярных растворителях, таких как метанол и этанол, окрашены в темноте, а под воздействием видимого света тускнеют. Это указывает на то, что полярность растворителя может влиять на изомеризацию и определять, будет ли то же соединение спиропирана существовать в форме SP или MC. Это свойство было использовано для создания химического сенсора для обнаружения загрязнения анилином [103]. Для реализации быстрого зондирования методом, не требующего сложного оборудования, целлюлозную бумагу на основе спиропирана погружали в водные растворы с разной концентрацией анилина. Наблюдаемое изменение цвета и интенсивности флуоресценции тестовых образцов с увеличением концентрации анилина позволила определить степень загрязнения анилином невооруженным глазом.

Помимо обнаружения анилина, спиропиран, содержащий амидиновую группу, был синтезирован для мониторинга качества воздуха [104]. Добавление воды к метанольному раствору спиропирана **74** способствовало самопроизвольному раскрытию кольца с образованием формы MC **75** (фиолетовый) (рис. 1.33).

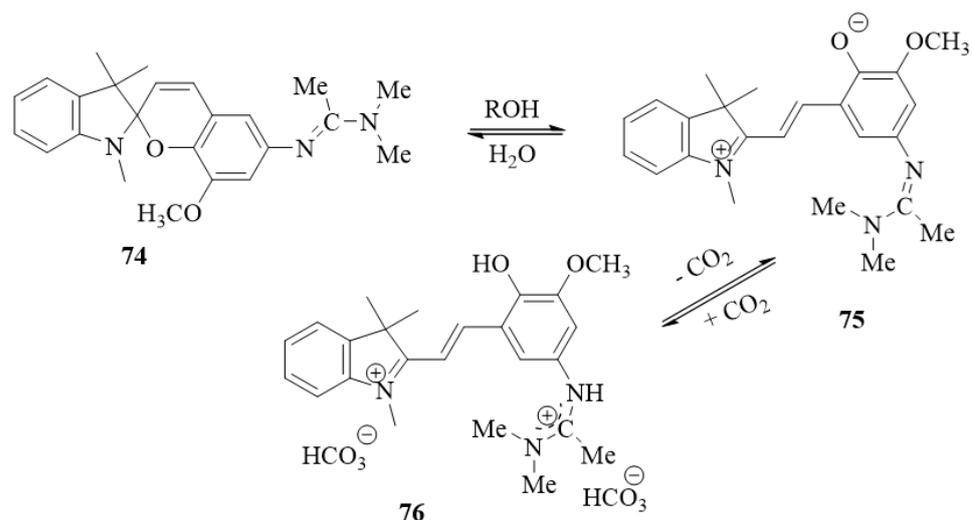


Рисунок 1.33. Спиропиран-замещенный амидиновой группой для визуального обнаружения CO₂.

При контакте с воздухом с низким уровнем CO₂ образовавшийся пурпурный раствор становился желтым, что можно сопоставить с появлением форм **76**. После удаления CO₂ из желтого раствора после продувания инертным газом или воздухом, цвет раствора вернулся к своему первоначальному пурпурному цвету. Это позволило в режиме реального времени контролировать концентрацию CO₂ в воздухе, что еще больше расширило возможности применения универсальных хемосенсоров на основе спиропирана.

Таким образом, производные спиропиранов могут служить эффективными инструментами для приложений, связанных с предотвращением загрязнений парами кислот и химикалиями, мониторингом окружающей среды и качества воздуха. Кроме того, свойство спиропирана взаимодействовать с кислотой может быть использовано для мониторинга pH в реальном времени без сложного оборудования.

1.4.3 Применения в биохимии

Еще одно захватывающее и перспективное применение фотохромного спиропирана - обнаружение биомолекул. Это особенно наглядно в случае нуклеиновых кислот, в частности ДНК [106]. “Закрытая” форма (SP) 6-нитроBIPS с четвертичным аминопропилем, присоединенным к индольному атому азота, не взаимодействует с ДНК, в то время как “открытая” форма (MC)

может связываться с ДНК путем интеркаляции [107]. Интеркаляция происходит потому, что плоская природа изомера МС и его повышенная полярность позволяет ему связываться с парами оснований ДНК. Однако громоздкие неплоские молекулы SP формы не соответствует парам оснований ДНК, и поэтому форма SP не интеркалируется с ДНК [108]. Более того, форма МС в основном интеркалируется в своей протонированной форме $МСН^+$, поскольку положительный заряд протонированной формы способствует более сильному электростатическому притяжению и к отрицательно заряженному фосфатному остову ДНК. Измерения линейного дихроизма подтвердили различия в связывании ДНК с “закрытыми” и “открытыми” формами спиропирана [108]. Кроме того, спектры облученного УФ-светом раствора спиропирана с ДНК и без ДНК дополнительно доказали предпочтительности взаимодействия между формой $МСН^+$ и ДНК. Полоса длин волн (512 нм), соответствующая форме МС, при добавлении ДНК смещалась до 420 нм (полоса поглощения формы $МСН^+$). Что еще более важно - изменение спектра поглощения раствора спиропирана продемонстрировало потенциал его использования для обнаружения и даже количественного определения концентрации ДНК. Однако аффинность взаимодействия ДНК со спиропираном была довольно слабой с константой связывания $2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Для дальнейшего улучшения ДНК-связывающих свойств спиропирана в 6'-положение бензопиранового фрагмента была введена еще одна положительно заряженная амидиновая группа [109]. Это привело к увеличению аффинности связывания с новой константой связывания $3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Интересно, что “открытый” изомер (МС) этого нового соединения был способен связываться с ДНК как в непротонированной, так и в протонированной формах, но протонированная форма $МСН^+$ была гораздо более сильным интеркалятором.

Подобно взаимодействию с ДНК, спиропиран также претерпевает протонирование с образованием формы $МСН^+$ при интеркалировании между парами оснований РНК, что приводит к изменению спектра поглощения

раствора. Путем количественной оценки этого изменения стало возможным обнаружить и даже количественно определить уровни экспрессии двухцепочечной РНК (дцРНК) из общего количества выделенных РНК из клеток. Авторы из Швеции использовали это свойство и показали, что спиропиран может надежно обнаруживать повышенные уровни дцРНК при обработке клеток колоректального рака 5-аза-2'-дезоксцитидином, ДНК-деметилирующим агентом, вызывающим гибель клеток за счет индукции клеточных дцРНК [109]. Этот результат демонстрирует потенциал использования общего уровня экспрессии дцРНК, измеренного с помощью спиропирана, в качестве прогностического маркера лекарственного лечения, который изменяет экспрессию дцРНК.

Фотохромное свойство спиропирана можно использовать для разработки «умного» регулятора ДНК. Хаммарсон и его коллеги представили концепцию двойного контроля ДНК-связывающего действия спиропирана с использованием одновременно внешних (световых) и внутренних (рН) раздражителей [109, 110]. Такое регулирование потенциально может быть применено для противоракового лечения. Например, “закрытый” изомер (SP) может быть преобразован в ДНК-МСН⁺ связывающую форму только при воздействии как УФ-излучения, так и в средах с низким рН, в то время как обратное преобразование может быть вызвано просто воздействием видимого света. Поскольку значение рН в раковых клетках значительно ниже, чем в соседних здоровых клетках [111-114], препараты на основе спиропирана будут избирательно связываться с ДНК в раковых клетках только после срабатывания внешнего раздражителя.

Способность обратимо раскручивать двойную спираль ДНК с помощью света можно использовать для фотозапуска различных биологических процессов. Обоснование использования спиропирана в качестве строительного блока для фотопереключаемой ДНК заключается в том, что её изомер МС имеет большее структурное сходство с основаниями ДНК, чем форма SP.

Следовательно, можно ожидать преимущественной способности изомера МС к участию в π - π стэкингových взаимодействиях с ДНК и, следовательно, повышения устойчивости двойной спирали.

Эта гипотеза была подтверждена в исследовании, основанном на изучении спиропираноконцевого гомотимидина [115]. Сообщалось также о функционализации длинноцепочечной ДНК, посредством чего был продемонстрирован контроль степени функционализации с помощью формы SP за счет эффективной фотоизомеризации спиропиранового фрагмента [116]. Недавно были синтезированы более сложные молекулы ДНК, функционализированные спиропираном, включающие фотопереключател в середину цепей. В этом контексте было обнаружено, что спиропиран устойчив к УФ-облучению [117]. Авторы предположили, что повышенная устойчивость связана с гашением триплетного состояния спиропирана соседними основаниями ДНК.

Еще одно новое применение спиропирана связано с неразрушающими методами обработки биологических систем. Для использования в биологических системах были разработаны спиропираны с минимальной цитотоксичностью. Благодаря протоколам скрининга, разработанным Мовием [110], многочисленные исследования позволили разработать спиропираны для флуоресцентной визуализации клеток, отслеживания молекул или структур-мишеней и даже захвата и высвобождения терапевтических материалов в клетках с минимальными побочными эффектами.

Спиропиран также можно адаптировать для обнаружения диагностических биомаркеров различных заболеваний человека. Было высказано предположение, что *бис*-спиропирановая диада может служить флуоресцентным зондом для мониторинга уровней внутриклеточного γ -глутамил-цистеинил-глицина (GSH) [118]. Аномальный GSH уровень связан с рядом заболеваний, таких как муковисцидоз, нейродегенеративные заболевания и рак [119-122]. В структуру зонда были включены три основных элемента: два

спиропирановых звена **77** и пиперазиновый фрагмент в качестве линкера для достижения прочного связывания с биполярными молекулами, богатая электронами *трет*-бутильная группа в б'-положении для получения стабильного оптического сигнала без фотохромного поведения при УФ-облучении и гидрофобной алкильной цепью для улучшения клеточной мембранной проводимости (рис. 1.34).

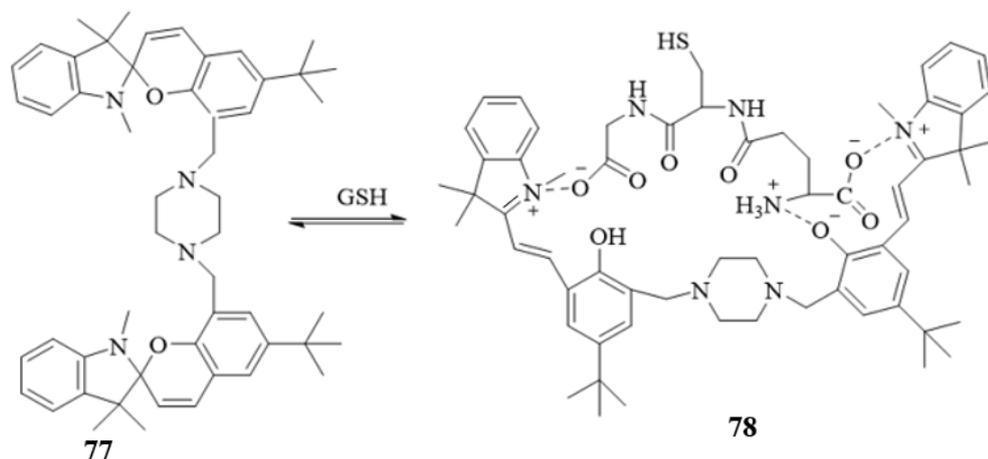


Рисунок 1.34. Схема фотохимического раскрытия цикла бис-спиропирана **77** в присутствии GSH.

В 20% растворе этанола спиропиран являлся бесцветным, а при УФ-облучении не происходило изменения спектра поглощения, что указывало на отсутствие формы MC. Однако добавление GSH привело к резкому изменению абсорбции раствора спиропирана в этаноле. Эмиссия спиропирана также смещалась с 517 нм без GSH до 643 нм в присутствии GSH при возбуждении на длине волны максимального поглощения.

Ким и соавторами [123] была разработана новая светочувствительная мицеллярная система с использованием спиропиран-гиперразветвленного полиглицерина (SP-hb-PG). Спиропиран использовал для инициирования многоветвленной полимеризации глицидола с раскрытием цикла с получением ряда гиперразветвленных полиглицеролов. SP-hb-PG образовывал самоорганизующиеся полимерные мицеллы в водной среде. Под действием УФ-облучения исходная гидрофобная форма SP изомеризуется в форму MC, что приводит к разрушению мицеллярных структур. Это структурное

изменение мицелл было обратимым при облучении видимым светом. Потенциал мицеллы SP-hb-PG для использования в качестве системы «прицельной» доставки лекарств был исследован с использованием пирена в качестве модельного гидрофобного терапевтического средства.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Реагенты и оборудование

Одномерные ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР спектры (для отнесения пиков в ^{13}C ЯМР использовалась методика АРТ, которая позволяет различить сигналы атомов углерода, связанные с одним или тремя атомами водорода от сигналов атома углерода с двумя атомами Н или без присоединённых атомов Н) и двумерные спектры ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC регистрировали на спектрометре Varian UNITY-300 300 МГц в растворе ДМСО- d_6 при температуре окружающей среды.

Инфракрасные спектры твердых образцов регистрировали на приборе Varian 3100 FT-IR Excalibur в диапазоне 400–4000 cm^{-1} в режиме нарушенного полного внутреннего отражения. Электронные спектры регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 5000 в диапазоне 200–800 нм в ацетонитриле. Микроанализ С, Н, и N проводили на анализаторе Perkin-Elmer 240С.

Данные монокристаллической рентгеновской дифракции получены на станции «Белок/XSA» [124, 125] Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва) с использованием CCD-детектора Rayonix SX165. Два набора данных для двух разных ориентаций кристалла были собраны в режиме φ -сканирования. Наборы данных были проиндексированы и интегрированы с использованием программного обеспечения XDS, а затем масштабированы и скорректированы для поглощения с помощью программы XSCALE [126]. Структуры определены прямыми методами и уточнены полноматричным методом наименьших квадратов по F^2 в анизотропном приближении для неводородных атомов. Кристаллические структуры были решены и уточнены с помощью графического интерфейса пользователя Olex2 [127], основанного на оригинальном алгоритме Шелдрика [128, 129]. Анализ кристаллографических данных выполнен при поддержке программы PLATON [130].

Фотофизические свойства изучали на спектрометре Agilent-8453 в лаборатории фотохимии НИИ физической и органической химии, ЮФУ и спектрофотометре Cary-50 Bio в Центре фотохимии ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (Москва).

Для синтеза изучаемых соединений использовали следующие коммерчески доступные реактивы: резорцин (98%) **P1**, фталевый ангидрид (99%) **P5**, гидразинкарботиоамид **TS3** (99%), и амины: 2-аминоэтан-1-ол (99%), пропан-2-амин (99.5%), 2-метилпропан-2-амин (98%), анилин (99.5%), *n*-толуидин (99.6%), 3,4-диметиланилин (98%), 4-нитроанилин (99%), 2,3-дихлоранилин (99%), 2,4-диметиланилин (99%), фенилметанамин (99.5%), фенилэтиламин (98%), гептан-2-амин (98%), полученные от компании Acros.

Соли металлов: кобальт(II) перхлорат гексагидрат $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99%), никель(II) перхлорат гексагидрат $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99%), меди(II) перхлорат гексагидрат $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98%), использовали в аналитически чистом виде (AlfaAesar, Merck).

L-цистеин (98%), L-гомоцистеин (98%), L-глутатион (97%), L-метионин (98%): Sigma-Aldrich, L-глицин (97%): AlfaAesar использовали без дополнительной очистки.

2.2 Синтез соединений

2.2.1 Синтез промежуточных продуктов

Для синтеза тиосемикарбазонов и енаминокетонов, содержащих спиропирановый фрагмент, были получены хелатофорно функционализированный оксаиндан **P10** и 4-замещенные тиосемикарбазиды ряда **TS(1–10)**.

2.2.1.1 Синтез 2,4-диформилрезорцина

Для синтеза целевых спиропирановых соединений был использован ароматический альдегид **P4**, синтезированный по реакции Раймера-Тимана, описанной в работе [139]. Исходным соединением для синтеза 2,4-

диформилрезорцина **P4** служил резорцин. Схема синтеза альдегида **P4** приведена на рис. 2.1.

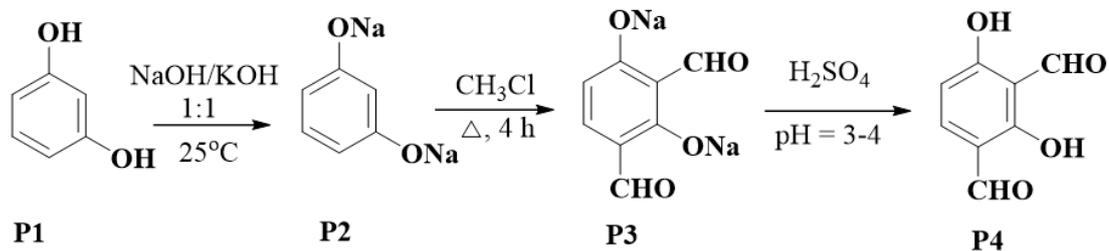


Рисунок 2.1. Схема синтеза 2,4-диформилрезорцина.

К раствору 80 г (2.00 моль) гидроксида натрия и 80 г (1.43 моль) гидроксида калия в 1 л воды прибавили 10 г резорцина (0.09 моль). Раствор выливали в 2-литровую круглодонную колбу, добавляли 50 мл хлороформа и кипятили 4 часа. Полученный раствор разливали в 2 колбы и нейтрализовывали концентрированной серной кислотой (до pH=4). Раствор в каждой колбе перегоняли с водяным паром. Из каждой колбы было получено около 300 мл дистиллята. После фильтрования получали бесцветный осадок.

Выход: 1.8 г (12%) $T_{\text{пл}} = 118\text{--}120^\circ\text{C}$.

2.2.1.2 Синтез 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида

7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегид **P10** был синтезирован по методике, описанной в работе [12]. Фталевый ангидрид **P5**, реагируя с метилмагний иодидом, образует 1-окси-1,3,3-триметилфталан **P6**. Перхлораты **P8** были получены взаимодействием соответствующего 1-окси-1,3,3-триметилфталана **P7** с хлорной кислотой (рис. 2.2).

3,3-диметилизобензофуран-1(3Н)-он (P6)

К 10.6 г (0.04 моль) магния в 150 мл абсолютного диэтилового эфира добавляли по каплям 28 мл йодистого метила (около 1 часа) и перемешивали в течение 30 минут. К образовавшемуся раствору CH_3MgI при охлаждении на водяной бане медленно добавляли 6.2 г (0.04 моль) фталевого ангидрида. Перемешивали в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Обработывали 10%

раствором серной кислоты. Эфирный слой отделяли, водный слой экстрагировали эфиром. Объединенный экстракт промывали водой, 5% раствором карбоната натрия, водой и оставляли на ночь с небольшим количеством сульфата натрия. Диэтиловый эфир перегоняли. Вещество представляет из себя бледно-желтый осадок.

Выход: 6.5 г (96%) $T_{пл} = 65-68\text{ }^{\circ}\text{C}$.

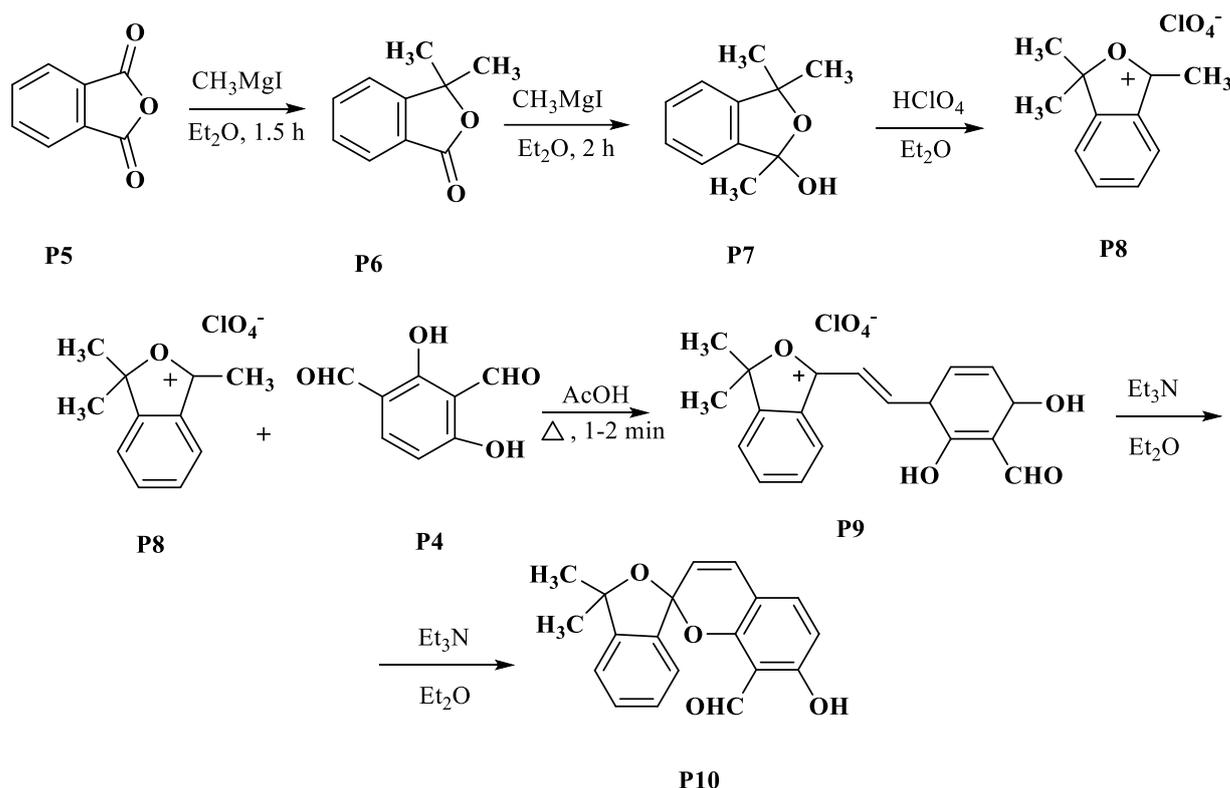


Рисунок 2.2. Схема синтеза 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида.

1,3,3-Триметил-1,3-дигидроизобензофуран-1-ол (P7)

К раствору **P6** 9.98 г (0.06 моль) в 134 мл тетрагидрофурана (ТГФ) прибавляли раствор CH_3MgI (1.86 г магния (0.08 моль), 4 мл йодистого метила, 22 мл диэтилового эфира). Смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре и обрабатывали насыщенным раствором хлорида аммония. Экстрагировали диэтиловым эфиром, эфирный экстракт промывали водой и сушили порошком сульфата натрия. Диэтиловый эфир отгоняли, оставшийся ТГФ упаривали, получая желто-оранжевый осадок.

Выход: 9.61 г (90%) $T_{пл} = 119–120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1,3,3-Триметил-1,3-дигидроизобензофуран-1-илиум перхлорат (P8)

К раствору 9.88 г **P7** (0.06 моль) в 55 мл Et_2O добавили раствор 6 мл HClO_4 в 15 мл Et_2O . Охлаждали льдом до образования осадка. Осадок фильтровали и промывали 3 раза диэтиловым эфиром, получая желтый осадок.

Выход: 5.20 г (36%).

1-(3-Формил-2,4-дигидроксистирил)-3,3-диметил-1,3-дигидроизобензофуран-1-илиум перхлорат (P9)

К раствору 1.57 г 2,4-диформилрезорцина **P4** (0.01 моль) в 7 мл ледяной уксусной кислоте, добавляли 2.578 г **P8** (0.01 моль) и кипятили 1-2 мин. Раствор оставляли на ночь при комнатной температуре. Красный осадок фильтровали и промывали 3 раза диэтиловым эфиром.

Выход: 3.33 г (81%).

7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегид (P10)

Приготовили суспензию 2.590 г **P9** (0.006 моль) в 30 мл диэтилового эфира. Добавляли 0.9 мл триэтиламина и оставляли на ночь. Осадок перекристаллизовали из тяжелого петролейного эфира, получая оранжевый осадок.

Выход: 1.01 г (52%) $T_{пл} = 103–105\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ^1H ЯМР ($\text{DMCO}-d_6$), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 11.60 (с, 1H, OH), 10.20 (с, 1H, CHO), 5.50–7.50 (м, 8H, H-аром.), 1.62 (с, 3H, CH_3), 1.57 (с, 3H, CH_3).

2.2.1.3 Синтез 4-замещенных тиосемикарбазидов

4-Замещенные тиосемикарбазиды **TS(1, 2, 4–10)** были синтезированы по методике, описанной в работе [140] (рис. 2.3). Тиосемикарбазид **TS3** ($\text{R} = \text{H}$) был приобретен у фирмы Acros.

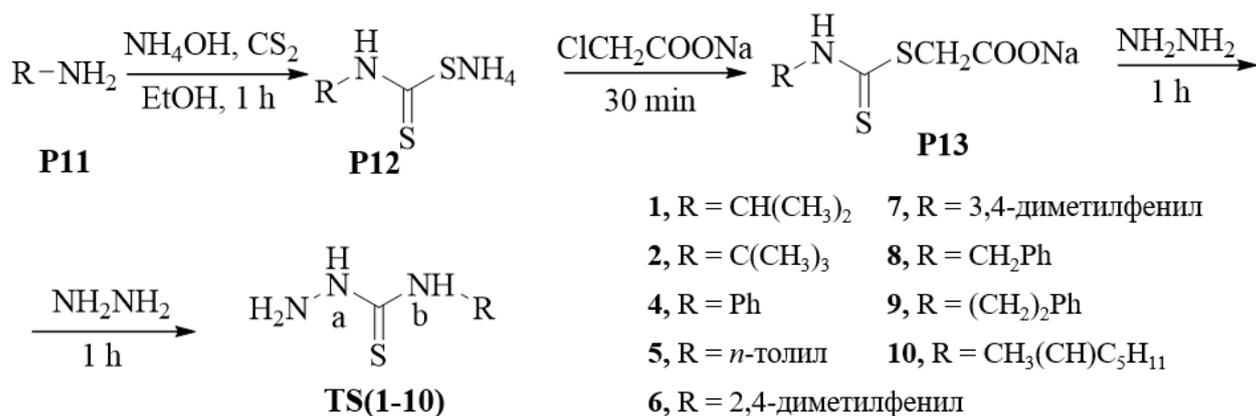


Рисунок 2.3. Схема синтеза 4-замещенных тиосемикарбазидов.

В 50 мл этанола растворили 0.10 моль соответствующего амина **P11**, затем добавляли 20 мл концентрированного NH₄OH, получая раствор желтого цвета. Затем добавляли 8 мл CS₂ в течение 10 минут. Смесь перемешивали в течение 1 часа и при энергичном перемешивании к реакционной смеси добавляли 14 г (0.12 моль) тонкоизмельченного монохлорацетата натрия, и смесь дополнительно перемешивали в течение 30 минут. Затем добавляли гидразингидрат (12.5 мл) и смесь перемешивали в течение часа. Смесь оставляли на ночь. Конечный тиосемикарбазид выпадал в виде осадка.

N-изопропилгидразинкарботиоамид (TS1)

Выход: 60% T_{пл} = 161–164 °C Цвет: белые кристаллы

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д., J/Гц: 8.53 (с, 1H, NH^a), 7.48 (д, 1H, NH^b), 4.35 (м, 1H, J = 8.51, 6.55, CH), 3.40 (с, 2H, NH₂), 1.12 (д, 6H, 2CH₃).

N-(трет-бутил)гидразинкарботиоамид (TS2)

Выход: 65% T_{пл} = 173–175 °C Цвет: белые кристаллы

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д., J/Гц: 8.40 (с, 1H, NH^a), 7.48 (с, 1H, NH^b), 4.48 (с, 2H, NH₂), 1.44 (с, 9H, 3CH₃).

N-фенилгидразинкарботиоамид (TS4)

Выход: 48% T_{пл} = 137–140 °C Цвет: белые кристаллы

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ, м.д., J/Гц: 8.49 (с, 1H, NH^a), 7.46 (д, 1H, NH^b), 7.46–7.24 (м, 5H, H-аром.), 4.45 (с, 2H, NH₂).

N-(*n*-толил)гидразинкарботиоамид (TS5)

Выход: 50% $T_{\text{пл}} = 168\text{--}170\text{ }^{\circ}\text{C}$ Цвет: белые кристаллы

Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 8.40 (с, 1H, NH^a), 7.48 (д, 1H, NH^b), 7.47–7.09 (м, 4H, H-аром.), 4.74 (с, 2H, NH₂), 2.26 (с, 3H, CH₃).

N-(2,4-диметилфенил)гидразинкарботиоамид (TS6)

Выход: 55% $T_{\text{пл}} = 182\text{--}185\text{ }^{\circ}\text{C}$ Цвет: белые кристаллы

Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 9.29 (с, 1H, NH^a), 9.00 (с, 1H, NH^b), 7.34–6.97 (м, 3H, H-аром.), 4.74 (с, 2H, NH₂), 2.26 (с, 3H, CH₃), 2.16 (с, 3H, CH₃).

N-(3,4-диметилфенил)гидразинкарботиоамид (TS7)

Выход: 49% $T_{\text{пл}} = 182\text{--}184\text{ }^{\circ}\text{C}$ Цвет: белые кристаллы

Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 9.52 (с, 1H, NH^a), 9.00 (с, 1H, NH^b), 7.34–7.04 (м, 3H, H-аром.), 4.77 (с, 2H, NH₂), 2.21 (с, 3H, CH₃), 2.19 (с, 3H, CH₃).

N-бензилгидразинкарботиоамид (TS8)

Выход: 54% $T_{\text{пл}} = 185\text{--}186\text{ }^{\circ}\text{C}$ Цвет: белые кристаллы

Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 10.4 (с, 1H, NH^a), 8.15 (с, 1H, NH^b), 7.31–7.27 (м, 5H, H-аром.), 4.01 (с, 2H, NH₂), 2.84 (м, 2H, CH₂-Ph).

N-фенетилгидразинкарботиоамид (TS9)

Выход: 52% $T_{\text{пл}} = 190\text{--}192\text{ }^{\circ}\text{C}$ Цвет: белые кристаллы

Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 10.4 (с, 1H, NH^a), 7.31 (с, 1H, NH^b), 7.25–7.19 (м, 5H, H-аром.), 4.21 (с, 2H, NH₂), 3.86 (м, 2H, CH₂-Ph), 2.72 (т, 2H, CH₂).

N-(гептан-2-ил)гидразинкарботиоамид (TS10)

Выход: 46% $T_{\text{пл}} = 184\text{--}187\text{ }^{\circ}\text{C}$ Цвет: белые кристаллы

Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 8.48 (с, 1H, NH^a), 7.44 (д, 1H, NH^b), 4.42 (с, 2H, NH₂), 4.26 (м, 1H, CH), 1.50–1.25 (м, 8H, 4CH₂), 1.07 (д, 3H, CH₃), 0.85 (т, 3H, CH₃).

2.2.2 Синтез тиосемикарбазонов

К раствору 1.00 ммоль 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида **P10** в 6 мл этанола приливали горячий раствор 1.00 ммоль соответствующего 4-замещенного тиосемикарбазида **TS(1-10)** в 6 мл этанола, кипятили 10 мин и отфильтровывали.

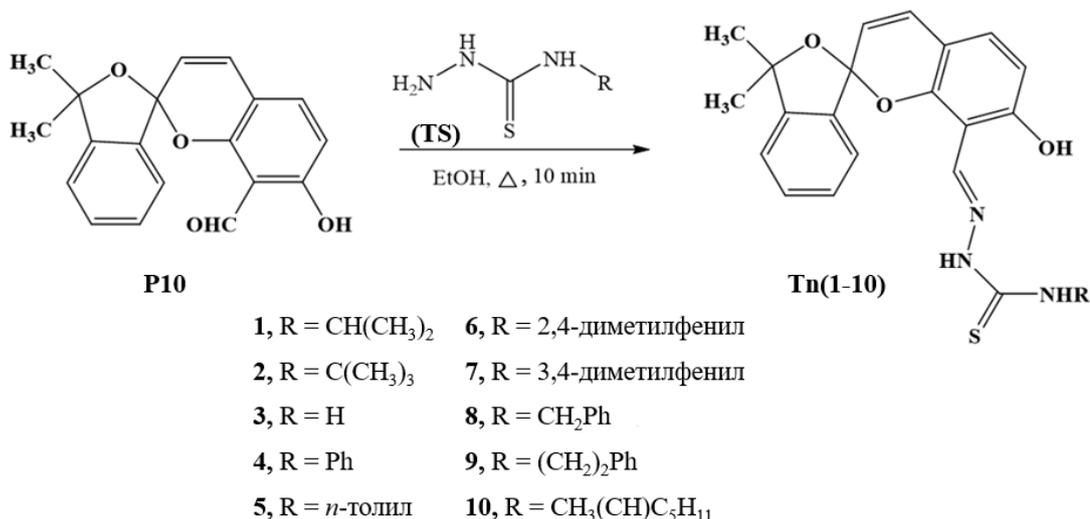
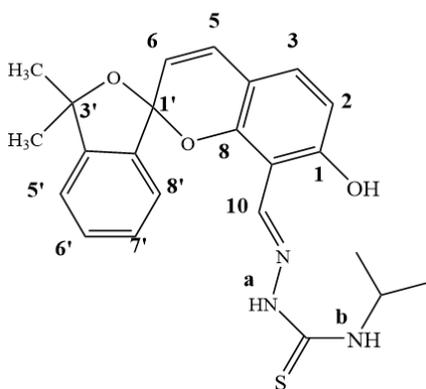


Рисунок 2.4. Схема синтеза тиосемикарбазонов **Tn(1-10)**.

2-((7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен)-N-изопропилгидразинкарботиоамид (**Tn1**)

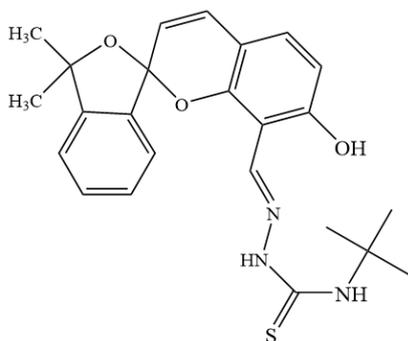


Выход: 52%. $T_{\text{пл}} = 186\text{--}190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Цвет: светло-розовый порошок. Найдено (%): С, 65.1; Н, 5.9; N, 10.0. $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$. Вычислено (%): С, 65.23; Н, 5.95; N, 9.92. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3401 (N-H^a), 3222 (O-H), 1610 (C=N), 1240 (C=S), 934 (C-O). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., J/Гц: 11.40 (с, 1H, NH^a), 10.29 (с, 1H, OH), 8.42 (с, 1H, H¹⁰), 7.89

(д, 1H, $J = 8.31$, NH^b), 7.49–7.34 (м, 4H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{8'}), 7.22 (д, 1H, $J = 8.37$, H³), 6.83 (д, 1H, $J = 9.64$, H⁵), 6.55 (д, 1H, $J = 8.38$, H²), 5.70 (д, 1H, $J = 9.64$, H⁶), 4.37 (к, 1H, $J = 7.00$, CH^{iPr}), 1.59 (с, 3H, CH₃), 1.44 (с, 3H, CH₃), 1.09 (д, 6H, $J = 6.56$, 2CH₃^{iPr}). ¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆), м.д.: 176.21 (C=S), 158.07 (C¹), 151.22 (C⁸), 148.23 (C^{4'}), 141.02 (C¹⁰), 139.46 (C^{9'}), 130.42 (C^{5'}), 129.87 (C³), 128.64 (C^{8'}), 126.23 (C⁵), 123.63 (C^{7'}), 121.22 (C^{6'}), 119.83 (C⁶), 112.51 (C⁴), 109.80 (C²), 107.84

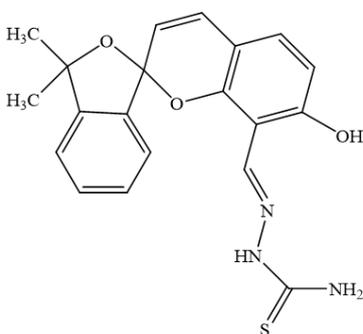
(C⁹), 106.78 (C^{1'}), 86.64 (C^{3'}), 46.10 (CH^{iPr}), 30.72 (CH₃), 28.85 (CH₃), 22.23 (2CH₃^{iPr}).

N-(Трет-бутил)-2-((7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен) гидразинкарботиоамид (Тн2)



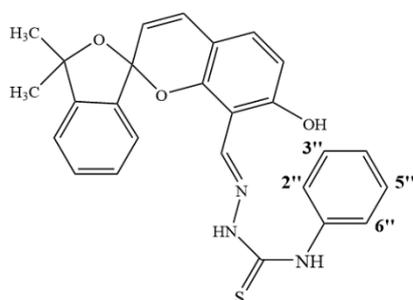
Выход: 40%. T_{пл} = 177–180 °С. Цвет: светло-розовый порошок. Найдено (%): С, 65.9; Н, 6.0; N, 9.7. C₂₄H₂₇N₃O₃S. Вычислено (%): С, 65.88; Н, 6.22; N, 9.60. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3394 (N–H^a), 3291 (O–H), 1608 (C=N), 1221 (C=S), 939 (C–O). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., J/Гц: 11.33 (с, 1H, NH^a), 10.57 (с, 1H, OH), 8.35 (с, 1H, H¹⁰), 7.53 (с, 1H, NH^b), 7.51–7.43 (м, 4H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{8'}), 7.22 (д, 1H, J = 8.37, H³), 6.85 (д, 1H, J = 9.64, H⁵), 6.57 (д, 1H, J = 8.39, H²), 5.70 (д, 1H, J = 9.64, H⁶), 1.60 (с, 3H, CH₃), 1.46 (с, 3H, CH₃), 1.40 (с, 9H, 3CH₃^{tBu}).

2-((7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен)гидразинкарботиоамид (Тн3)



Выход: 58%. T_{пл} = 110–112 °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 62.9; Н, 5.0; N, 11.5. C₂₀H₁₉N₃O₃S. Вычислено (%): С, 62.97; Н, 5.02; N, 11.02. ИК спектр ν , см⁻¹: 3405 (N–H^a), 3248 (O–H), 1607 (C=N), 1275 (C=S), 938 (C–O). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., J/Гц: 11.53 (с, 1H, NH^a), 9.99 (с, 1H, OH), 8.47 (с, 1H, H¹⁰), 8.03; 7.81 (с, с, 2H, NH^b), 7.48–7.30 (м, 4H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{8'}), 7.26 (д, 1H, J = 8.41, H³), 6.86 (д, 1H, J = 9.60, H⁵), 6.57 (д, 1H, J = 8.40, H²), 5.71 (д, 1H, J = 9.60, H⁶), 1.63 (с, 3H, CH₃), 1.46 (с, 3H, CH₃).

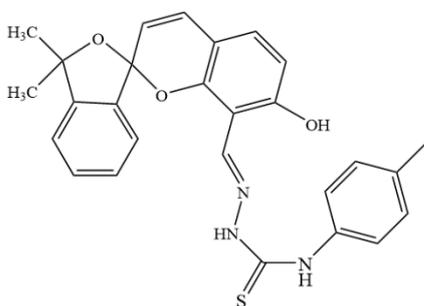
2-((7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен)-N-фенилгидразинкарботиоамид (Тн4)



Выход: 50%. T_{пл} = 212–214 °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 68.8; Н, 5.2; N, 9.0. C₂₆H₂₃N₃O₃S. Вычислено (%): С, 68.25; Н, 5.07; N,

9.18. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3408 (N–H^a), 3253 (O–H), 1615 (C=N), 1246 (C=S), 948 (C–O). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., *J*/Гц: 11.87 (с, 1H, NH^a), 10.34 (с, 1H, OH), 9.94 (с, 1H, NH^b), 8.56 (с, 1H, H¹⁰), 7.47–7.41 (м, 2H, H^{5'}, H^{6'}), 7.36–7.33 (м, 2H, H^{7'}, H^{8'}), 7.25–7.28 (м, 2H, H^{5''}, H^{6''}), 7.16–7.19 (м, 4H, H³, H^{2''}, H^{3''}, H^{4''}), 6.87 (д, 1H, *J* = 9.62, H⁵), 6.58 (д, 1H, *J* = 8.38, H²), 5.72 (д, 1H, *J* = 9.62, H⁶), 1.63 (с, 3H, CH₃), 1.46 (с, 3H, CH₃).

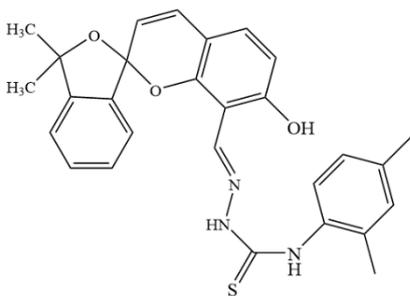
2-((7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен)-N-(*n*-толил) гидразинкарботиоамид (Тп5)



Выход: 42%. $T_{\text{пл}} = 223\text{--}225$ °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 68.6; Н, 5.4; N, 9.0. $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$. Вычислено (%): С, 68.79; Н, 5.30; N, 8.91. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3407 (N–H^a), 3270 (O–H), 1609 (C=N), 1249 (C=S), 926 (C–O). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., *J*/Гц: 11.83 (с, 1H, NH^a), 10.02

(с, 1H, OH), 9.90 (с, 1H, NH^b), 8.56 (с, 1H, H¹⁰) 7.49–7.42 (м, 3H, H^{8'}, H^{3''}, H^{5''}), 7.42–7.37 (м, 3H, H^{2''}, H^{5'}, H^{6''}), 7.20–7.25 (м, 2H, H^{6'}, H^{7'}), 7.13 (д, 1H, *J* = 8.42, H³), 6.87 (д, 1H, *J* = 9.67, H⁵), 6.59 (д, 1H, *J* = 8.42, H²), 5.73 (д, 1H, *J* = 9.67, H⁶), 2.29 (с, 3H, CH₃–Ph), 1.64 (с, 3H, CH₃), 1.47 (с, 3H, CH₃).

N-(2,4-Диметилфенил)-2-((7-гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил) метилен) гидразинкарботиоамид (Тп6)

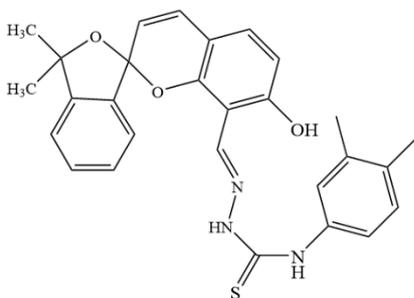


Выход: 51%. $T_{\text{пл}} = 198\text{--}200$ °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 69.5; Н, 5.4; N, 8.9. $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$. Вычислено (%): С, 69.42; Н, 5.37; N, 8.68. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3400 (N–H^a), 3262 (O–H), 1608 (C=N), 1206 (C=S), 933 (C–O). Спектр ¹H ЯМР

(ДМСО-*d*₆), δ , м.д., *J*/Гц: 11.76 (с, 1H, NH^a), 10.02 (с, 1H, OH), 9.62 (с, 1H, NH^b), 8.56 (с, 1H, H¹⁰), 7.43–7.42 (м, 4H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{8'}), 7.26 (д, 1H, *J* = 8.37, H³), 7.20–6.69 (м, 3H, H^{5''}, H^{3''}, H^{6''}), 6.87 (д, 1H, *J* = 9.65, H⁵), 6.58 (д, 1H, *J* = 8.37,

H²), 5.72 (д, 1H, $J = 9.65$, H⁶), 2.28 (с, 3H, CH₃-Ph), 2.11 (с, 3H, CH₃-Ph), 1.64 (с, 3H, CH₃), 1.47 (с, 3H, CH₃).

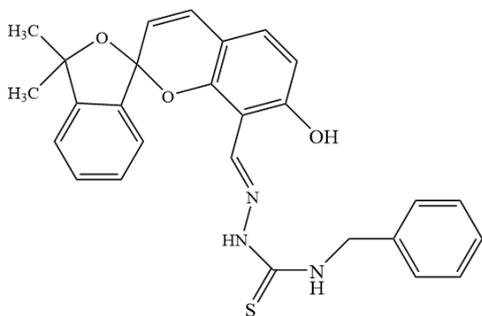
N-(3,4-диметилфенил)-2-((7-гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил) метилен) гидразин-1-карботиоамид (Тп7)



Выход: 53%. $T_{пл} = 199-203$ °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 69.2; Н, 5.5; N, 8.6. $C_{28}H_{27}N_3O_3S$. Вычислено (%): С, 69.26; Н, 5.60; N, 8.65. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3410 (N-H^a), 3219 (O-H), 1616 (C=N), 1208 (C=S), 941 (C-O). Спектр ¹H ЯМР

(DMCO-*d*₆), δ , м.д., $J/\Gamma\psi$: 11.52 (с, 1H, NH^a), 10.46 (с, 1H, OH), 9.52 (с, 1H, HN^b), 8.52 (с, 1H, H¹⁰), 7.47–7.34 (м, 4H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{8'}), 7.25–7.14 (м, 3H, H^{2''}, H^{5''}, H^{6''}), 7.07 (д, 1H, $J = 8.39$, H³), 6.85 (д, 1H, $J = 9.62$, H⁵), 6.57 (д, 1H, $J = 8.39$, H²), 5.69 (д, 1H, $J = 9.61$, H⁶), 2.22 (с, 3H, CH₃-Ph), 2.22 (с, 3H, CH₃-Ph), 1.66 (с, 3H, CH₃), 1.50 (с, 3H, CH₃).

N-Бензил-2-((7-гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил) метилен) гидразин-1-карботиоамид (Тп8)

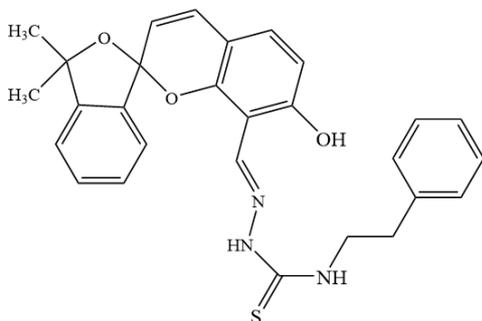


Выход: 49%. $T_{пл} = 195-197$ °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 69.5; Н, 5.4; N, 8.9. $C_{27}H_{25}N_3O_3S$. Вычислено (%): С, 68.77; Н, 5.34; N, 8.91. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3420 (N-H^a), 3242 (O-H), 1618 (C=N), 1223 (C=S), 933 (C-O).

Спектр ¹H ЯМР (DMCO-*d*₆), δ , м.д., $J/\Gamma\psi$: 11.65 (с, 1H, NH^a), 10.04 (с, 1H, OH), 8.79 (с, 1H, $J = 6.19$, HN^b), 8.49 (с, 1H, H¹⁰), 7.50–7.33 (м, 4H, H^{3''}, H^{5''}, H^{6'}, H^{8'}), 7.30–7.19 (м, 6H, H^{5'}, H^{7'}, H^{2''}, H^{4''}, H^{6''}, H³), 6.84 (д, 1H, $J = 9.66$, H⁵), 6.54 (д, 1H, $J = 8.39$, H²), 5.69 (д, 1H, $J = 9.66$, H⁶), 4.74 (м, 2H, CH₂), 1.60 (с, 3H, CH₃), 1.44 (с, 3H, CH₃). ¹³C ЯМР (DMCO-*d*₆), м.д.: 177.70 (C=S), 157.95 (C¹), 151.36 (C⁸), 148.18 (C^{4'}), 141.41 (C¹⁰), 139.64 (C^{1''}), 139.39 (C^{9'}), 130.42 (C^{5'}), 130.06 (C³), 129.30 (C^{4''}), 128.57 (C^{3''}, C^{5''}), 127.56 (C^{2''}, C^{6''}), 127.20 (C^{8'}), 126.18 (C⁵), 123.66

(C^{7'}), 121.23 (C^{6'}), 119.87 (C⁶), 112.52 (C⁴), 109.90 (C²), 107.58 (C⁹), 106.84 (C^{1'}), 86.69 (C^{3'}), 47.30 (CH₂-Ph), 30.79 (CH₃), 29.14 (CH₃).

2-((7-Гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен)-N-фенетилгидразин-1-карботиоамид (Тп9)



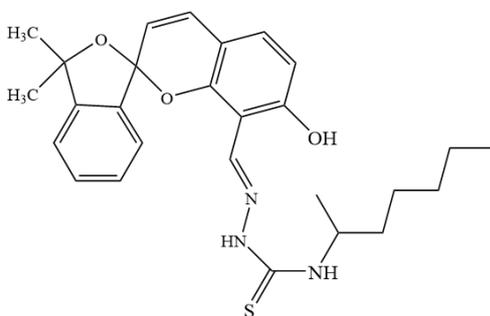
Выход: 61%. T_{пл} = 197–200 °С. Цвет: розовый порошок. Найдено (%): С, 69.5; Н, 5.4; N, 8.9.

C₂₈H₂₇N₃O₃S. Вычислено (%): С, 69.26; Н, 5.60; N, 8.65. ИК спектр, ν, см⁻¹: 3409 (N-H^a), 3253 (O-H), 1619 (C=N), 1259 (C=S), 941 (C-O).

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д., J/Гц: 11.55

(с, 1H, NH^a), 10.10 (с, 1H, OH), 8.45 (с, 1H, NH^b), 8.27 (с, 1H, H¹⁰), 7.49–7.38 (м, 3H, H^{8'}, H^{6''}, H^{2''}), 7.34–7.16 (м, 7H, H^{5'}–H^{7'}, H³, H^{3''}–H^{5''}), 6.84 (д, 1H, J = 9.64, H⁵), 6.56 (д, 1H, J = 8.37, H²), 5.70 (д, 1H, J = 9.64, H⁶), 3.61 (м, 2H, CH₂), 2.80 (т, 2H, J = 7.65, CH₂), 1.60 (с, 3H, CH₃), 1.44 (с, 3H, CH₃).

Гептан-2-ил-2-((7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-ил)метилен)гидразин-1-карботиоамид (Тп10)



Выход: 41%. T_{пл} = 190–195 °С. Цвет: светло-розовый порошок. Найдено (%): С 67.3; Н 7.0;

N 8.6. C₂₇H₃₃N₃O₃S. Вычислено (%): С 67.61; Н 6.94; N 8.76. ИК спектр, ν, см⁻¹: 3379 (N-H^a), 3290 (O-H), 1612 (C=N), 1256 (C=S), 948 (C-O).

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.д., J/Гц: 11.40 (с, 1H, NH^a), 10.32 (с, 1H, OH), 8.44 (с, 1H, H¹⁰), 7.88 (д, 1H, NH^b), 7.52–7.33 (м, 4H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{8'}), 7.25 (д, 1H, J = 8.37, H³), 6.86 (д, 1H, J = 9.69, H⁵), 6.58 (д, 1H, J = 8.37, H²), 5.71 (д, 1H, J = 9.69, H⁶), 4.32 (м, 1H, CH^{heptyl}), 1.62 (с, 3H, CH₃), 1.47 (с, 3H, CH₃), 1.39–1.24 (м, 8H, 4CH₂^{heptyl}), 1.07 (д, 3H, -CH-CH₃^{heptyl}), 0.83 (т, 3H, -CH₂-CH₃^{heptyl}).

2.2.3 Синтез енаминокетонов

Енаминокетоны **Ен(1–7)** получены взаимодействием спиропирана **Р10** с соответствующим амином в этаноле, схема синтеза приведена на рис. 2.5. К

горячему раствору 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'H-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида **P10** (1.2 ммоль) в 5 мл этанола добавляли горячий раствор 1.20 ммоль соответствующего амина в 5 мл этанола. Раствор нагревали до точки кипения и кипятили с обратным холодильником в течение 3 минут. После медленного охлаждения выпадал красный осадок, который отфильтровывали и перекристаллизовывали из хлористого метилена.

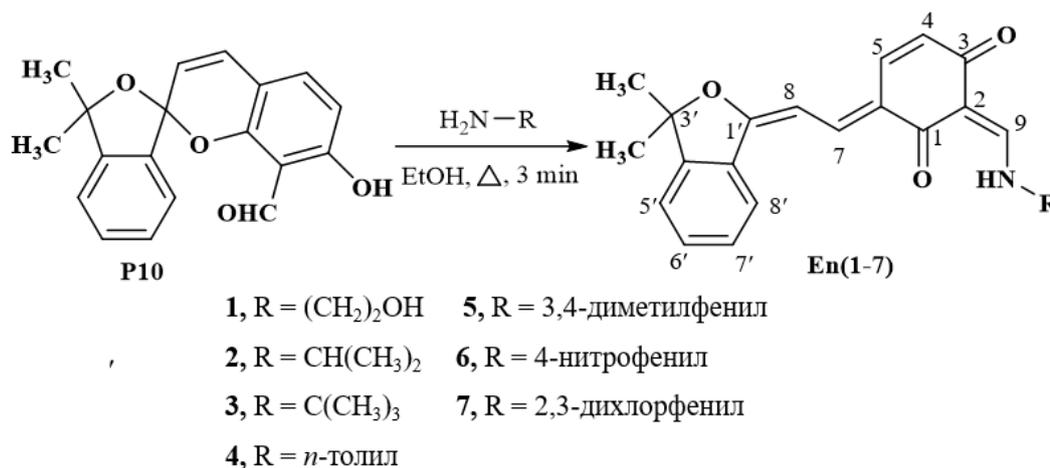
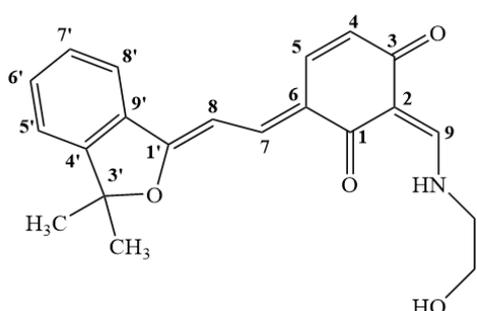


Рисунок 2.5. Схема синтеза енаминокетонов **En**.

В растворе ДМСО присутствуют два изомера, в описании ¹H и ¹³C ЯМР спектров приведены сигналы основного изомера.

2-(((2-Гидроксиэтил)амино)метилен)-6-(2-(3- метилизобензофуран-1(3H)-илиден)этилиден)циклогекс-4-ен-1,3-дион (En1)

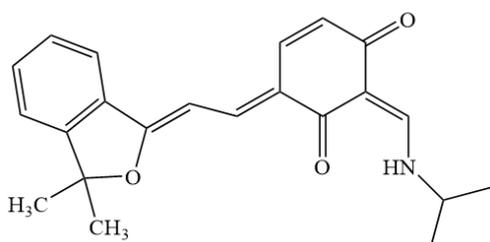


Выход: 40%. $T_{\text{пл}} = 136\text{--}138$ °С. Цвет: красный.
 Найдено (%): С, 71.5; Н, 6.1; N, 4.3. C₂₁H₂₁NO₄.
 Вычислено (%): С, 71.78; Н, 6.02; N, 3.99. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3232 (O–H), 3065 (N–H), 2972 (C–H), 2925 (C–H), 2852 (C–H), 1645 (C=O).

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., $J/\text{Гц}$: 11.63 (д, 1H, $J = 14.00$, NH), 8.23 (д, 1H, $J = 14.00$, H⁹), 8.00 (д, 1H, $J = 13.40$, H⁷), 7.99 (д, 1H, $J = 6.90$, H^{8'}), 7.82 (д, 1H, $J = 9.90$, H⁵), 7.66–7.43 (м, 3H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}), 6.77 (д, 1H, $J = 13.40$, H⁸), 5.99 (д, 1H, $J = 9.90$, H⁴), 5.02 (с, 1H, OH), 3.56 (с, 4H, CH₂CH₂), 1.64 (с, 6H, 2CH₃).
¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆), м.д.: 184.68 (C³), 183.75 (C¹), 165.08 (C^{1'}), 160.26 (C⁹),

150.42 (C^{4'}), 136.57 (C⁷), 135.35 (C⁵), 132.06 (C^{6'}), 131.63 (C^{9'}), 129.27 (C^{7'}), 124.42 (C⁶), 123.89 (C⁴), 122.67 (C^{8'}), 121.74 (C^{5'}), 108.35 (C²), 93.67 (C⁸), 91.97 (C^{3'}), 60.44 (CH₂), 52.55 (CH₂), 27.86 (2CH₃).

2-((Изопропиламино)метилден)-6-(2-(3-метилизобензофуран-1(3Н)-илиден)этилиден)циклогекс-4-ен-1,3-дион (En2)



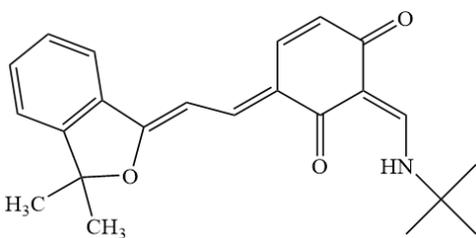
Выход: 38%. T_{пл} = 123–124 °С. Цвет: красный.

Найдено (%): С, 75.7; Н, 6.8; N, 4.2. C₂₂H₂₃NO₃.

Вычислено (%): С, 75.62; Н, 6.63; N, 4.01. ИК спектр, ν, см⁻¹: 3047 (N–H), 2971 (C–H), 2926 (C–H), 2869 (C–H), 1645 (C=O).

Спектр ¹H ЯМР (DMCO-*d*₆), δ, м.д., J/Гц: 11.80 (д, 1H, J = 14.00, NH), 8.29 (д, 1H, J = 14.00, H⁹), 8.02 (д, 1H, J = 13.30, H⁷), 7.98 (д, 1H, J = 6.90, H^{8'}), 7.81 (д, 1H, J = 10.20, H⁵), 7.65–7.54 (м, 2H, H^{5'}, H^{6'}), 7.54–7.44 (м, 1H, H^{7'}), 6.78 (д, 1H, J = 13.30, H⁸), 5.99 (д, 1H, J = 10.10, H⁴), 3.88 (дк, 1H, J = 13.40, 6.70, CH^{iPr}), 1.63 (с, 6H, 2CH₃), 1.27 (д, 6H, J = 6.50, 2CH₃^{iPr}). ¹³C ЯМР (DMCO-*d*₆), м.д.: 184.58 (C³), 183.83 (C¹), 165.27 (C^{1'}), 157.51 (C⁹), 150.47 (C^{4'}), 136.81 (C⁷), 135.37 (C⁵), 132.11 (C^{6'}), 131.58 (C^{9'}), 129.28 (C^{7'}), 124.23 (C⁶), 123.81 (C⁴), 122.70 (C^{8'}), 121.76 (C^{5'}), 108.06 (C²), 93.69 (C⁸), 91.97 (C^{3'}), 51.58 (CH^{iPr}), 23.25 (2CH₃^{iPr}), 27.85 (2CH₃).

2-((Трет-бутиламино)метилден)-6-(2-(3-метилизобензофуран-1(3Н)-илиден)этилиден)циклогекс-4-ен-1,3-дион (En3)



Выход: 36%. T_{пл} = 130–132 °С. Цвет: красный.

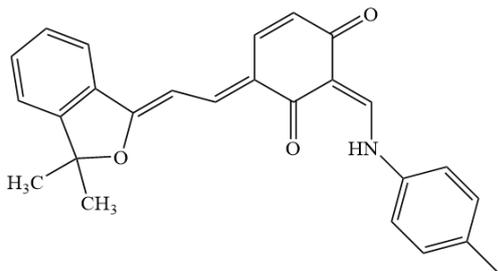
Найдено (%) С, 75.4; Н, 6.7; N, 3.8. C₂₃H₂₅NO₃.

Вычислено (%): С, 76.01; Н, 6.93; N, 3.85. ИК спектр, ν, см⁻¹: 3052 (N–H), 2969 (C–H), 2928 (C–H), 2872 (C–H), 1640 (C=O).

Спектр ¹H ЯМР (DMCO-*d*₆), δ, м.д., J/Гц: 12.30 (д, 1H, J = 14.20, NH), 8.30 (д, 1H, J = 14.10, H⁹), 8.04 (дд, 1H, J = 13.70, 1.50, H⁷), 7.98 (д, 1H, J = 6.90, H^{8'}), 7.81 (д, 1H, J = 9.90, H⁵), 7.65–7.50 (м, 2H, H^{5'}, H^{6'}), 7.50–7.39 (м, 1H, H^{7'}), 6.78 (дд, 1H, J = 13.20; 4.86, H⁸), 6.01 (дд, 1H, J = 10.10; 1.50, H⁴), 1.62 (с, 6H, 2CH₃), 1.45–1.25 (м, 9H, 3CH₃^{tBu}). ¹³C ЯМР (DMCO-*d*₆),

м.д.: 184.55 (C³), 183.87 (C¹), 165.47 (C^{1'}), 155.19 (C⁹), 150.52 (C^{4'}), 137.08 (C⁷), 135.46 (C⁵), 132.17 (C^{6'}), 131.54 (C^{9'}), 129.30 (C^{7'}), 124.10 (C⁶), 123.70 (C⁴), 122.73 (C^{8'}), 121.76 (C^{5'}), 108.02 (C²), 93.72 (C⁸), 92.01 (C^{3'}), 54.79 (C^{tBu}), 29.38 (C_{CH₃^{tBu}), 27.83 (2C_{CH₃}).}

2-((3,3-Диметилизобензофуран-1(3Н)-илиден)этилиден)-2-((*n*-толиламино)метилен)циклогекс-4-ен-1,3-дион (Еп4)



Выход: 51%. $T_{пл} = 190-192$ °С. Цвет: красный.

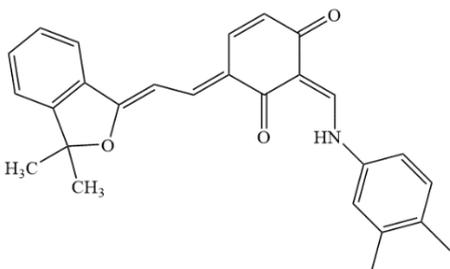
Найдено (%): С 78.4; Н 5.7; N 3.1. C₂₆H₂₃NO₃.

Вычислено (%): С 78.57; Н 5.83; N 3.52. ИК

спектр, ν , см⁻¹: 3047 (N–H), 2971 (C–H), 2869 (C–H), 1649 (C=O). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-

*d*₆), δ , м.д., *J*/Гц: 13.62 (д, 1H, *J* = 13.30, NH), 8.67 (д, 1H, *J* = 13.30; 5.55, H⁹), 8.10 (д, 1H, *J* = 13.23, H⁷), 8.02 (д, 1H, *J* = 6.61, H^{8'}), 7.92 (д, 1H, *J* = 10.09, H⁵), 7.48–7.70 (м, 3H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}), 7.30–7.47 (м, 2H, H^{2''}, H^{6''}), 7.20–7.32 (м, 2H, H^{3''}, H^{5''}), 6.84 (д, 1H, *J* = 13.23, H⁸), 6.08 (д, 1H, *J* = 10.09, H⁴), 2.31 (с, 3H, CH₃–Ph), 1.66 (с, 6H, 2CH₃). ¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆), м.д.: 184.67 (C³), 182.07 (C¹), 166.12 (C^{1'}), 151.32 (C⁹), 150.69 (C^{4'}), 137.75 (C⁷), 136.34 (C⁵), 136.14 (C^{1''}), 136.04 (C^{4''}), 132.34 (C^{6'}), 131.51 (C^{9'}), 130.82 (C^{5''}), 130.77 (C^{3''}), 129.34 (C^{7'}), 123.58 (C⁶), 123.25 (C⁴), 122.89 (C^{8'}), 121.80 (C^{5'}), 118.75 (C^{2''}, C^{6''}), 109.86 (C²), 93.88 (C⁸), 92.34 (C^{3'}), 27.81 (2C_{CH₃}), 20.95 (C_{CH₃}–Ph).

2-((3,3-Диметилизобензофуран-1(3Н)-илиден)этилиден)-2-(((3,4-диметилфенил)амино)метилен)циклогекс-4-ен-1,3-дион (Еп5)



Выход: 55%. $T_{пл} = 170-172$ °С. Цвет: красный.

Найдено (%): С 78.7; Н 6.0; N 3.2. C₂₇H₂₅NO₃.

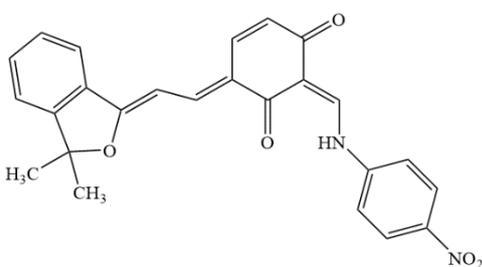
Вычислено (%): С 78.81; Н 6.12; N 3.40. ИК

спектр, ν , см⁻¹: 3045 (N–H), 2974 (C–H), 2920 (C–H), 2857 (C–H), 1646 (C=O). Спектр ¹H ЯМР

(ДМСО-*d*₆), δ , м.д., *J*/Гц: 13.63 (д, 1H, *J* = 13.30, NH), 8.66 (дд, 1H, *J* = 13.30; 5.95, H⁹), 8.06–8.19 (м, 1H, H⁷), 7.97–8.06 (м, 1H, H^{8'}), 7.86–7.97 (м, 1H, H⁵),

7.39–7.72 (м, 3H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}), 7.27–7.41 (м, 1H, H^{5''}), 7.21 (м, 2H, H^{2''}, H^{6''}), 6.85 (д, 1H, $J = 13.20$; 6.06, H⁸), 6.08 (дд, 1H, $J = 10.10$; 1.50, H⁴), 2.26 (с, 3H, CH₃–Ph), 2.21 (с, 3H, CH₃–Ph), 1.66 (с, 6H, 2CH₃). ¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆), м.д.: 184.67 (C³), 184.65 (C¹), 166.09 (C^{1'}), 151.18 (C⁹), 150.69 (C^{4'}), 138.66 (C^{3''}), 137.73 (C⁷), 136.66 (C^{4''}), 136.28 (C⁵), 135.02 (C^{1''}), 132.33 (C^{6'}), 131.51 (C^{9'}), 131.19 (C^{2''}), 129.33 (C^{7'}), 123.61 (C⁶), 123.57 (C⁴), 122.88 (C^{8'}), 121.80 (C^{5'}), 119.53 (C^{5''}), 116.17 (C^{6''}), 110.10 (C²), 93.87 (C⁸), 92.32 (C^{3'}), 27.81 (2CH₃), 19.86 (4''-CH₃–Ph), 19.32 (3''-CH₃–Ph).

6-((3,3-Диметилизобензофуран-1(3H)-илиден)этилиден)-2-(((4-нитрофенил)амино)метилен)циклогекс-4-ен-1,3-дион (Еп6)

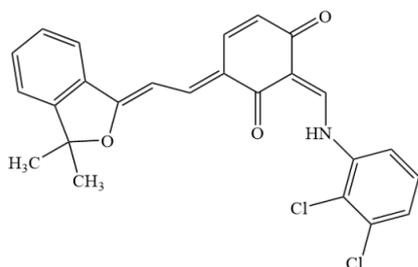


Выход: 37%. $T_{пл} = 138–140$ °С. Цвет: сливово-красный. Найдено (%): С, 70.7; Н, 5.0; N, 6.9. $C_{25}H_{20}N_2O_5$. Вычислено (%): С, 70.09; Н, 4.71; N, 6.54. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3075 (N–H), 2977 (C–H), 2926 (C–H), 1649 (C=O), 1523^{ас}, 1321^с (NO₂).

Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ , м.д., J/Γ ц: 13.51 (д, 1H, $J = 12.79$, NH), 8.69 (дд, 1H, $J = 12.76$, 5.20, H⁹), 8.18–8.25 (м, 1H, H⁷, H^{8'}), 8.06 (д, 1H, H⁵), 7.89–7.91 (м, 2H, H^{5'}, H^{6'}), 7.72 (д, 2H, $J = 8.56$, H^{6''}, H^{2''}), 7.56 (м, 2H, H^{5''}, H^{3''}), 7.48 (м, 2H, H^{7'}), 6.58 (дд, 1H, $J = 13.43$; 5.15, H⁸), 6.07 (д, 1H, $J = 10.05$; 1.62, H⁴), 1.63 (с, 6H, 2CH₃).

с: симметричное валентное колебание; *ас*: антисимметричное валентное колебания NO₂ группы.

2-(((2,3-Дихлорфенил)амино)метилен)-6-(2-(3,3-диметилизобензофуран-1(3H)-илиден)этилиден)циклогекс-4-ен-1,3-дион (Еп7)



Выход: 41%. $T_{пл} = 168–170$ °С. Цвет: красный. Найдено (%) С 66.2; Н 4.2; N 3.2. $C_{25}H_{19}Cl_2NO_3$. Вычислено (%): С 66.38; Н 4.23; N 3.10. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3074 (N–H), 2926 (C–H), 2866 (C–H), 1640 (C=O), 862 (C–Cl). Спектр ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆), δ ,

м.д., J/Γ ц: 14.08 (д, 1H, $J = 12.40$, NH), 8.77 (дд, 1H, $J = 12.20$; 5.30, H⁹), 8.07–

8.26 (м, 1H, H⁷), 8.04 (д, 1H, $J = 7.60$, H⁸), 7.88–7.99 (м, 1H, H⁵), 7.71–7.42 (м, 6H, H^{5'}, H^{6'}, H^{7'}, H^{4''}, H^{5''}), 6.89 (дд, 1H, $J = 13.30$; 5.48, H⁸), 6.12 (д, 1H, $J = 10.10$; 1.55, H⁴), 1.67 (с, 6H, 2CH₃). ¹³C ЯМР (DMCO-*d*₆), м.д.: 185.42 (C³), 184.70 (C¹), 166.82 (C^{1'}), 151.21 (C⁹), 150.88 (C^{4'}), 138.51 (C⁷), 138.11 (C^{1''}), 137.15 (C⁵), 133.00 (C^{3''}), 132.56 (C^{6'}), 131.42 (C^{5''}), 132.56 (C^{9'}), 129.75 (C^{7'}), 123.73 (C⁴), 123.46 (C^{4''}), 123.06 (C^{2''}), 121.83 (C^{8'}), 123.31 (C^{5'}) 122.08 (C⁶), 111.91 (C^{6''}), 111.34 (C²), 93.97 (C⁸), 92.71 (C^{3'}), 27.76 (2CH₃).

2.3 Методика квантово-химических исследований

Квантово-химическое моделирование исследуемых соединений было выполнено в рамках теории функционала плотности (DFT). Для всех расчетов использовалась программа Gaussian'09 [131]. Использовали гибридный обменно-корреляционный функционал B3LYP [132] и валентно-расщепленные базисные наборы гауссовых функций 6-311++G(d,p) и 6-311G(d) [133, 134]. Атомные координаты всех изомеров были оптимизированы без каких-либо ограничений по симметрии. Стационарные точки на поверхности потенциальной энергии характеризовали расчетом частот нормальных колебаний. Влияние растворителя учитывалось в рамках приближения непрерывно поляризуемой среды (PCM) со стандартными параметрами растворителя [135-137]. Для визуализации результатов расчетов использовались программы ChemCraft.

ИК спектры рассчитывали в приближении гармонического осциллятора с поправочным коэффициентом 0.9679 для масштабирования основных частот колебаний [138]. УФ спектры были смоделированы методом время-зависимого DFT (TD-DFT). Для расчетов УФ спектров использовались координаты атомов, оптимизированные для раствора ДМСО.

2.4 Использование тиосемикарбазона Tп8 для аналитического обнаружения аминокислот

Растворы аминокислот с концентрацией 5.0×10^{-3} М готовили, растворяя точные навески соединений в бидистиллированной воде. Растворы

необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением исходного раствора бидистиллированной водой. Исходный раствор тиосемикарбазона **Tn8** (5.0×10^{-4} М) готовили растворением точной навески в ацетонитриле. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением исходного раствора ацетонитрилом. Трис-НСl буферный раствор с рН 7.4 готовили, разбавляя 25 мл 0.2 М раствора трис(гидроксиметил)аминометана до 100 мл 0.1 М НСl, контролируя значение рН с помощью рН-метра.

Для изучения взаимодействия между тиосемикарбазоном **Tn8** и аминокислотой раствор L-цистеина Cys, L-гомоцистеина Hcy, L-глутатиона GSH, L-метионина Met или L-глицина Gly с концентрацией в диапазоне 0.0– 1.0×10^{-3} М) добавляли к раствору **Tn8** (конечная концентрация 5.0×10^{-5} М; растворитель – смесь ацетонитрила с трис-НСl буферным раствором с рН 7.4 (50:50, по объему)). Смесь выдерживали в темноте в течение 25 мин, затем регистрировали электронный спектр поглощения на спектрофотометре Cary 50, снабженном Пельтье-термостатом (Varian, США). Константу связывания для комплекса аминотиола с тиосемикарбазоном рассчитывали по формуле 2.1:

$$\frac{1}{A_i} = \frac{1}{\varepsilon[Tn8]} + \frac{1}{\varepsilon\beta[Tn8][GSH]_i} \quad (2.1)$$

где A_i : оптическая плотность при 450 нм в присутствии i -той концентрации аналита [GSH] (М);

ε : молярный коэффициент светопоглощения тиосемикарбазона **Tn8** ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$);

[Tn8]: концентрация тиосемикарбазона **Tn8** (М);

β : константа связывания между **Tn8** и аминокислотой (M^{-1}).

Константа скорости реакции рассчитывалась по уравнению 2.2:

$$\ln \frac{C_o}{C_o - x} = kt \quad (2.2)$$

где C_o : исходная концентрация тиосемикарбазона (М);

x : количество прореагировавшего тиосемикарбазона;

t : время (минут); k : константа скорости (минут⁻¹).

2.5 Определение биологической активности

2.5.1 Анализ цитотоксичности *in vitro*

Цитотоксическую активность определяли на основе метода МТТ, который впервые был описан Tim Mosmann, 1983 [141]. Это метод оценки жизнеспособности клеток посредством способности восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид: желтый) до формазанового комплекса (фиолетовый) под действием фермента дегидрогеназы в митохондриях [142, 143]. Четыре линии раковых клеток высевали с плотностью 1.0×10^4 клеток/мл в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 72 часов. Пробы с концентрациями 128, 32, 8 и 2 мкг/мл исследуемого вещества добавляли и инкубировали в течение 72 часов. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл). Планшеты инкубировали в течение 4 часов, после чего образовавшиеся пурпурные кристаллы формазана растворяли в ДМСО. Оптическую плотность (OD) считывали с помощью спектрофотометрического микропланшета BioTek, при тестовой длине волны 540 нм. Процент ингибирования раковых клеток определяли по формуле 2.3:

$$A = \frac{OD_o - OD_s}{OD_o - OD_{DMSO}} \times 100 \quad (2.3)$$

Где A : Ингибирование клеток (%),

OD_o : поглощение клеток без добавления исследуемого вещества,

OD_{DMSO} : поглощение ДМСО раствора (контроль),

OD_s : поглощение образца после реакции.

Эксперименты проводили по три раза. Значения IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) рассчитывали с использованием программного обеспечения Rawdata.

Эксперименты по анализу устойчивости раковых клеток проводились в лаборатории прикладной биохимии Химического института, Вьетнамской академии наук и технологий.

Анализ противоопухолевой активности соединений **En(1–3)** проводили по методу Skehan (1990) [144-149] с использованием сульфородамина В в биологических лабораториях Биологического института, Вьетнамской академии наук и технологий, Вьетнам.

2.5.2 Определение антиоксидантной активности методом DPPH

Анализ DPPH является одним из наиболее распространенных методов определения антиоксидантной активности [150-154]. 1,1-Дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) образуется в виде стабильного свободного радикала. Антиоксидантная активность проявляется изменением окраски DPPH, которое измеряется спектрофотометром UV/Vis при 515–520 нм [150, 155-158]. Образцы растворяли в ДМСО для получения серии концентраций от 2 до 128 мкг/мл. DPPH разбавляли метанолом для приготовления раствора 1 мМ. Аликвоту этого раствора объемом 3 мл смешивали с образцом и инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Затем измеряли оптическую плотность при 517 нм. В качестве контроля использовали метанольный раствор DPPH без анализируемого образца. Способность образца нейтрализовать свободный радикал (SC%) рассчитывается по формуле 2.4:

$$SC = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100\% \quad (2.4)$$

Где SC: способность образца нейтрализовать свободный радикал DPPH (антиоксидантная активность),

A_0 : поглощение контрольного образца,

A_s : поглощение образца после реакции.

Для определения значение EC_{50} (полумаксимальная эффективная концентрация) величину SC определяли для растворов различной концентрации (2–128 мкг/мл). Для сравнения использовали кверцетин.

Эксперименты по определению антиоксидантной активности проводились в лаборатории прикладной биохимии Химического института, Вьетнамской академии наук и технологий.

2.6 Прогнозирование фармакокинетики и прогноз токсичности (ADMET)

Для оценки лекарственного подобия синтезированных соединений было проведено исследование *in silico* ADMET (Абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность). Расчёты HIA (всасывание в кишечнике человека-human intestinal absorption) и прогноз токсичности были выполнены с использованием онлайн программы PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>). TPSA (площадь топологической полярной поверхности), a-acc (количество акцепторов водородной связи), a-don (количество доноров водородной связи), b-rotN (количество вращающихся связей), LogP (логарифм коэффициента распределения соединения между n-октанолом и водой) и оценка нарушений правил Липински и Вебера проводили с использованием программного обеспечения SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

2.7 Молекулярный докинг

В области молекулярного моделирования молекулярный докинг является прогностическим методом, который позволяет оценить возможность

образования стабильного комплекса одной молекулы (гость) и другой (хозяин). Наиболее вероятная ориентация, в свою очередь, может быть использована для прогнозирования силы связи между двумя молекулами, а также места связывания “гость-хозяин” [159]. Докинг играет важную роль в прогнозировании сродства и активности лекарств по отношению к белкам, тем самым предсказывая способность активировать или ингибировать функциональный белок. Кроме того, докинг также помогает предсказать активный сайт и благоприятную ориентацию и конфигурацию субстрата, участвующего в реакции при рассмотрении каталитического механизма фермента [160]. Построение исследовательской модели молекулярного докинга состоит из четырех основных этапов: (1) подготовка и оптимизация структуры лиганда (гостя), (2) подготовка и оптимизация структуры белка, (3) докинг, и (4) анализ результатов докинга. Эти шаги представлены на рис. 2.6.

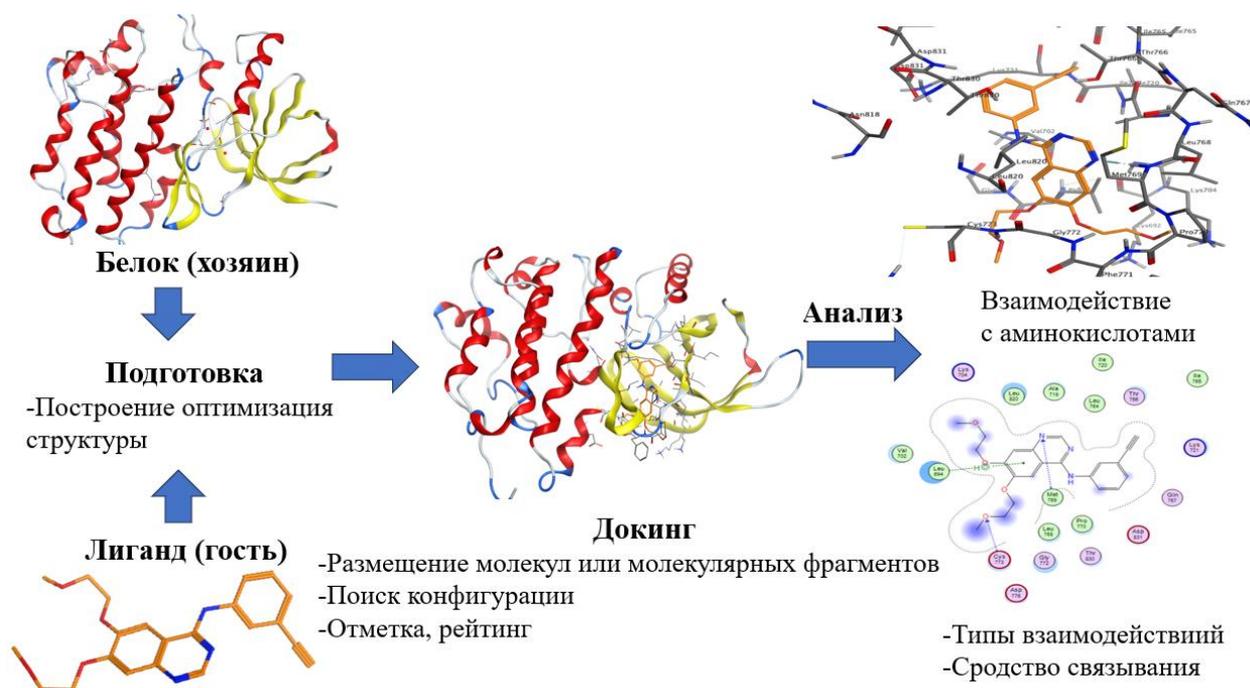


Рисунок 2.6. Основные этапы метода молекулярного докинга.

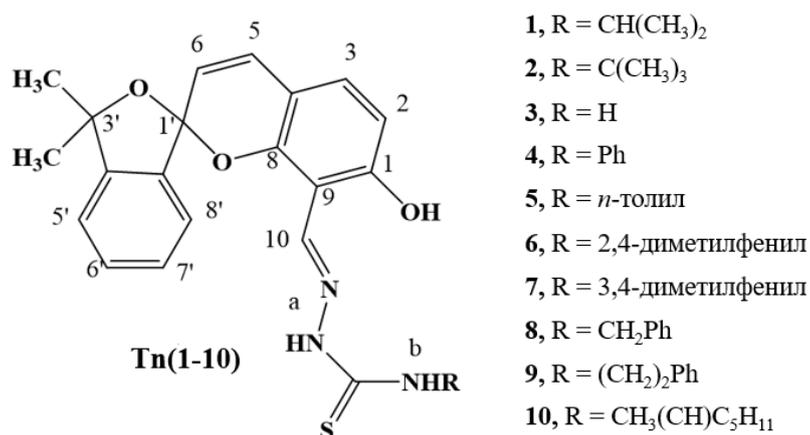
В этом исследовании, кристаллографическая структура целевого белка была получена из Protein DataBank (идентификатор PDB: 4HJO, разрешение 2.75 Å, <https://www.rcsb.org/structure/4HJO>) [161] и рассматривалась в качестве мишени (хозяина) для молекулярного докинга. Все несвязанные молекулы воды

удаляли и структуры аминокислотных остатков проверяли перед восстановлением активного центра фермента. 2D химические структуры соединения были построены с помощью программы Avogadro. Структуры молекул были оптимизированы по энергии в модуле минимизации и молекулярной динамики программы MOE 2014.09 [162-164]. В процессе минимизации энергии использовали силовое поле Amber10:ЕНТ [165, 166]. Структуры молекул оптимизировались до достижения изменения энергии в $0.0001 \text{ ккал.моль}^{-1}$. Процесс докинга проводили с помощью программы MOE 2014.09. Первоначально методом триангуляция (Triangle Matching) определилась до 25 возможных положений гостевой молекулы в активном центре хозяина, для которых затем проводилась минимизация энергии. В качестве оптимальной конформации принимали конформацию с минимальной полной энергией, что соответствует максимальной энергии связывания “гость-хозяин”. Природа взаимодействий “гость-хозяин” анализировались с помощью программы MOE 2014.09.

Глава 3. Обсуждение результатов

3.1 Тиосемикарбазоны

Как упоминалось выше, области применения спиропирана и производных на его основе все больше расширяются и включают биоматериалы, сенсоры, молекулярные оптические устройства и т. д. Добавление функциональной группы в молекулу спиропирана открывает новые возможности применения. На этой основе синтезирована серия тиосемикарбазонов, содержащих спиропирановый фрагмент [167, 168]. Структурные особенности, способность образовывать комплексы с ионами металлов, фотохромные свойства, и биологическая активность ряда тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** представлены ниже:



3.1.1 Результаты структурных исследований методами ИК, ЯМР спектроскопии и электронной спектроскопии

Для идентификации функциональных групп, присутствующих в соединениях, использовали ИК спектроскопию. А для определения органического каркаса молекул использовали ЯМР спектроскопию.

В ИК спектрах соединений **Tn(1–10)** проявляется характеристические полосы поглощения в области 3379–3420 см⁻¹ соответствующие валентным колебаниям связей N–H. Также отмечается полоса поглощения валентных колебаний OH группы, которая проявляется в области 3219–3291 см⁻¹. Характерная для связи C=N полоса поглощения проявляется в области 1608–

1619 cm^{-1} . Валентные колебания C=S группы наблюдаются в области 1206–1275 cm^{-1} и $\text{C}_{\text{spiro}}\text{-O}$ группы (пиранового кольца) в районе 926–948 cm^{-1} . В таблице 1 представлены данные ИК спектроскопии полученных соединений **Tn(1–10)**.

Таблица 1. Данные ИК-спектроскопии тиосемикарбазонов **Tn(1–10)**.

Соед.	R	ν_{OH}	$\nu_{\text{Cspiro-O}}$	$\nu_{\text{NH}}^{\text{a}}$	$\nu_{\text{C=S}}$	$\nu_{\text{C=N}}$
Tn1	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	3222	934	3401	1240	1610
Tn2	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	3291	939	3394	1221	1608
Tn3	H	3248	938	3405	1275	1607
Tn4	Ph	3253	948	3408	1246	1615
Tn5	<i>n</i> -толил	3270	926	3407	1249	1609
Tn6	2,4-диметилфенил	3262	933	3400	1206	1608
Tn7	3,4-диметилфенил	3219	941	3410	1208	1616
Tn8	CH_2Ph	3242	933	3420	1223	1618
Tn9	$(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$	3253	941	3409	1259	1619
Tn10	$\text{CH}_3(\text{CH})\text{C}_5\text{H}_{11}$	3290	948	3379	1256	1612

В ^1H ЯМР спектрах соединений **Tn(1–10)** присутствуют сигналы характерные для всех протонсодержащих группировок, соответствующих общей структуре тиосемикарбазонов. Было установлено, что в процессе реакции образуются тиосемикарбазоны **Tn(1–10)**, в которых спиропирановый фрагмент находится в циклической или “закрытой” форме, о чем свидетельствуют сигналы двух диастереотопных метильных групп гетеренового фрагмента молекулы, проявляющихся в виде двух трёхпротонных синглетов в области 1.44–1.47 и 1.59–1.66 м.д. (в таблице S2 Приложения).

Сигналы протона OH группы в соединениях **Tn(1–10)** наблюдаются в виде уширенного синглетного сигнала в области 9.99–10.57 м.д. Протоны NH^{a} группы гидразонного фрагмента проявляются в виде синглетных сигналов в области 11.33–11.87 м.д. Сигналы тиамидного фрагмента (NH^{b}) **Tn(1,2,4–10)** наблюдаются в области 7.53–9.90 м.д. В спектре тиосемикарбазона **Tn3** (R=H) протоны NH_2 группы тиамидного фрагмента проявляются в виде широких синглетов при 7.81 и 8.03 м.д. Сигналы протонов H^5 и H^6 пиранового кольца

обнаруживаются в виде дублетов (в области H^5 : 6.84–6.87 м.д. и H^6 : 5.69–5.73 м.д. соответственно) с характерной константой спин-спинового взаимодействия $J_{H^5-H^6} = 9.60-9.69$ Гц. Высокое значение константы свидетельствует о локализации двойной связи $C^5=C^6$. Сигналы протонов H^2 и H^3 обнаруживаются в виде дублета в области 6.54–6.59 и 7.22–7.26 м.д. с более низкими характеристическими константами спин-спинового взаимодействия ($J_{H^2-H^3} = 8.37-8.42$ Гц) в сравнении с H^5-H^6 , что свидетельствует о меньшей двоевязанности атомов $C^2=C^3$ за счет делокализации электронной плотности в циклическом ароматическом фрагменте. Сигналы протонов бензольного кольца гетареновой части молекулы ($H^{5'}-H^{8'}$) наблюдаются в виде сложного перекрывающегося мультиплета в области 7.34–7.49 м.д. Протоны H^{10} азометиновой группы обнаруживаются в виде синглетных сигналов в области 8.35–8.56 м.д. В спектре соединения **Tn5** наблюдается трёхпротонный синглетный сигнал метильной группы, находящейся в *para*-положении по отношению к амидному атому азота при 2.29 м.д. В спектре соединения **Tn6** метильные группы, находящиеся в *para*- и *орто*-положении по отношению к амидному атому азота, наблюдаются в виде двух трёхпротонных сигналов в области 2.11–2.28 м.д.

Для точного отнесения сигналов в спектре 1H ЯМР тиосемикарбазонов использовали $^1H-^1H$ COSY и $^1H-^1H$ NOESY спектры, а отнесение сигналов в спектре ^{13}C ЯМР выполняли с помощью данных спектров $^1H-^{13}C$ HSQC и $^1H-^{13}C$ HMBC. Для примера приведены спектры соединения **Tn1** ($R=CH(CH_3)_2$): 1H ЯМР (рис. 3.1), ^{13}C ЯМР (рис. 3.2), $^1H-^1H$ COSY (рис. 3.3), $^1H-^1H$ NOESY (рис. 3.4), $^1H-^{13}C$ HSQC (рис. 3.5) и $^1H-^{13}C$ HMBC (рис. 3.6).

Как и в случае с другими тиосемикарбазонами, данные спектров 1H ЯМР показывают, что в растворе соединения **Tn1** спиропирановый фрагмент находится в “закрытой” форме. Сигналы двух метильных групп гетеренового фрагмента молекулы, проявляющихся в виде двух трёхпротонных синглетов в области 1.44 и 1.59 м.д. Протоны от двух метильных групп изопропильного

фрагмента проявляются в виде дублетного сигнала с интенсивностью 6Н в области 1.09 м. д. ($J = 6.56$ Гц). Протон ОН группы наблюдается в виде уширенного синглетного сигнала в области 10.29 м.д. Протон NH^a группы гидразонного фрагмента проявляется в виде широкого синглетного сигнала с центром тяжести $\delta = 11.40$ м.д. Протон NH^b группы проявляется в виде дублета в области 7.89 м.д. В этом случае наблюдается спин-спиновое взаимодействие с протоном СН группы изопропильного фрагмента, константа взаимодействия $J = 8.31$ Гц.

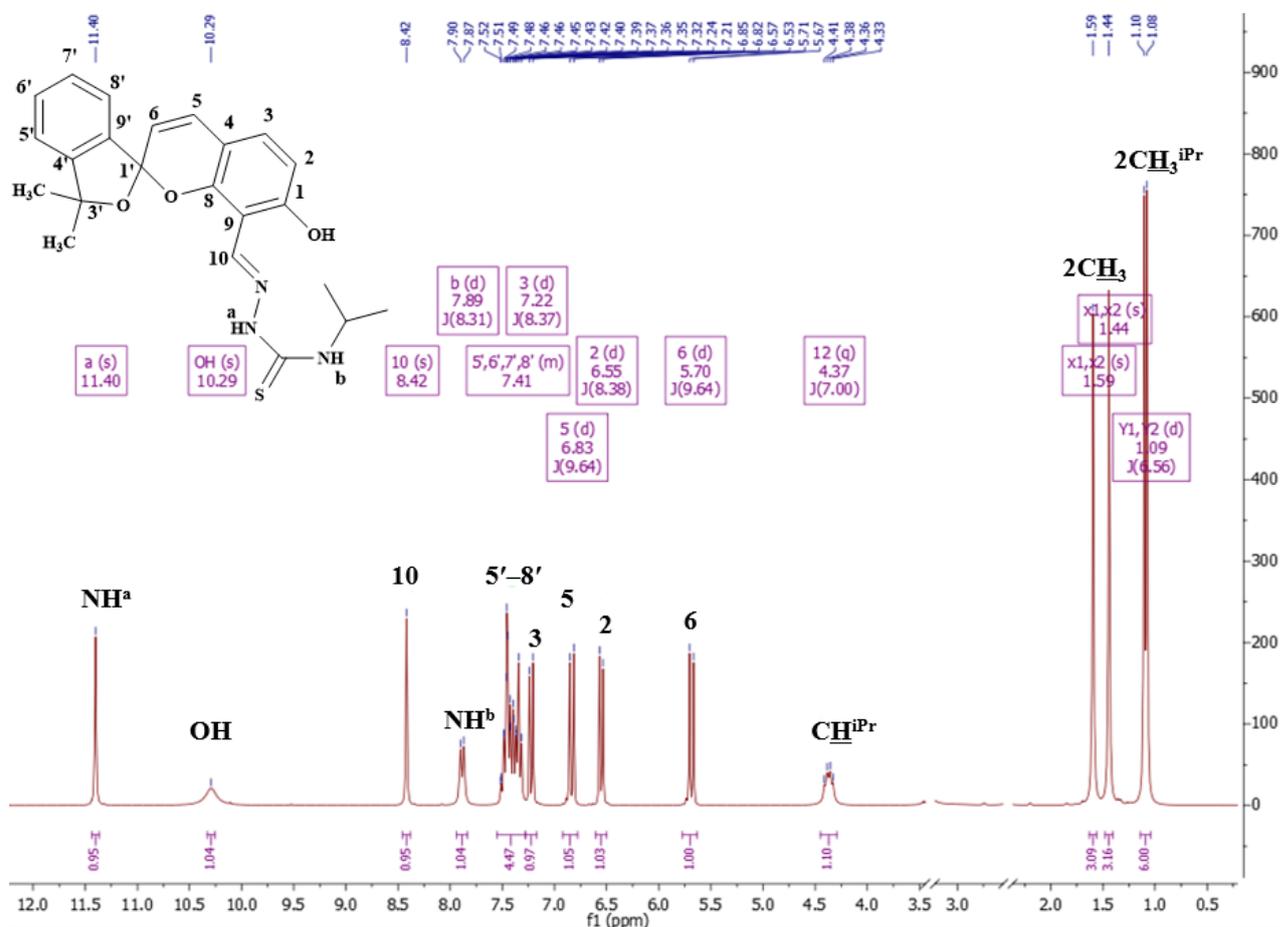


Рисунок 3.1. Спектр ^1H ЯМР тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) в $\text{DMSO-}d_6$.

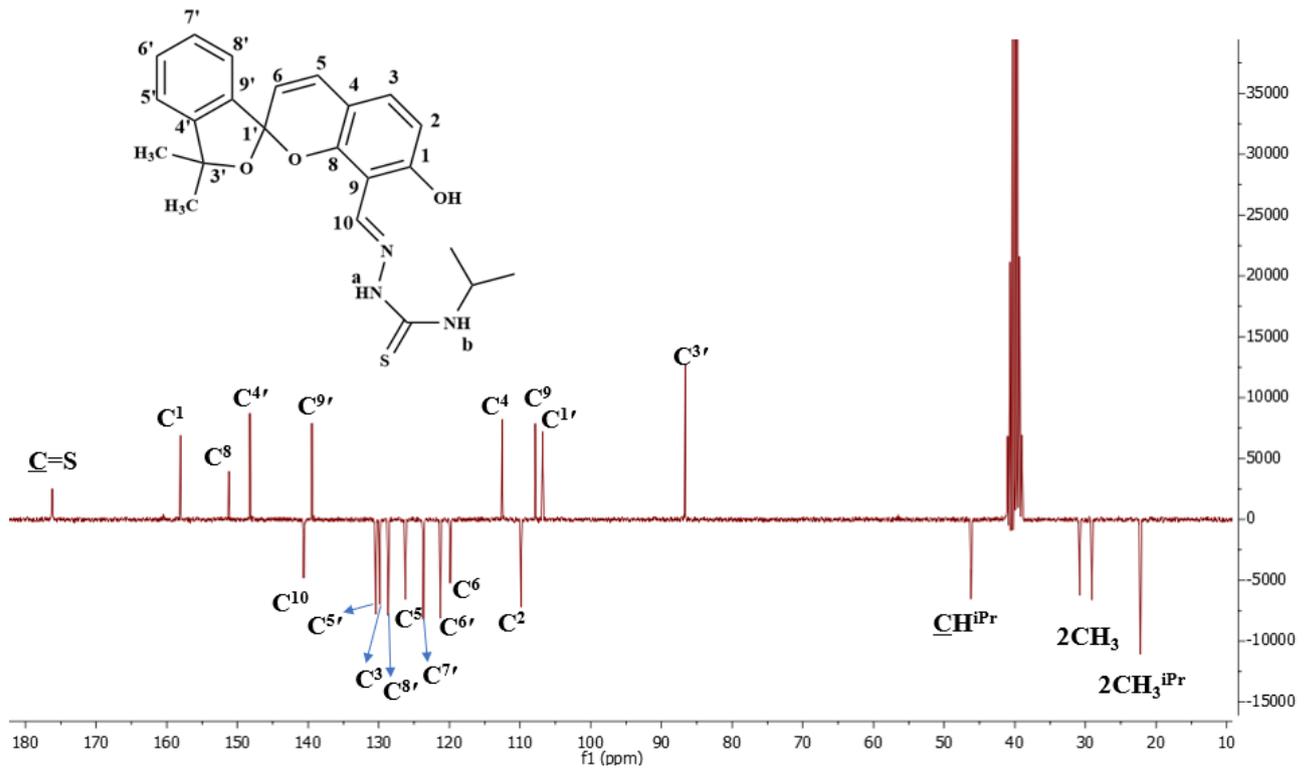


Рисунок 3.2. Спектр ^{13}C ЯМР тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)
в ДМСО- d_6 .

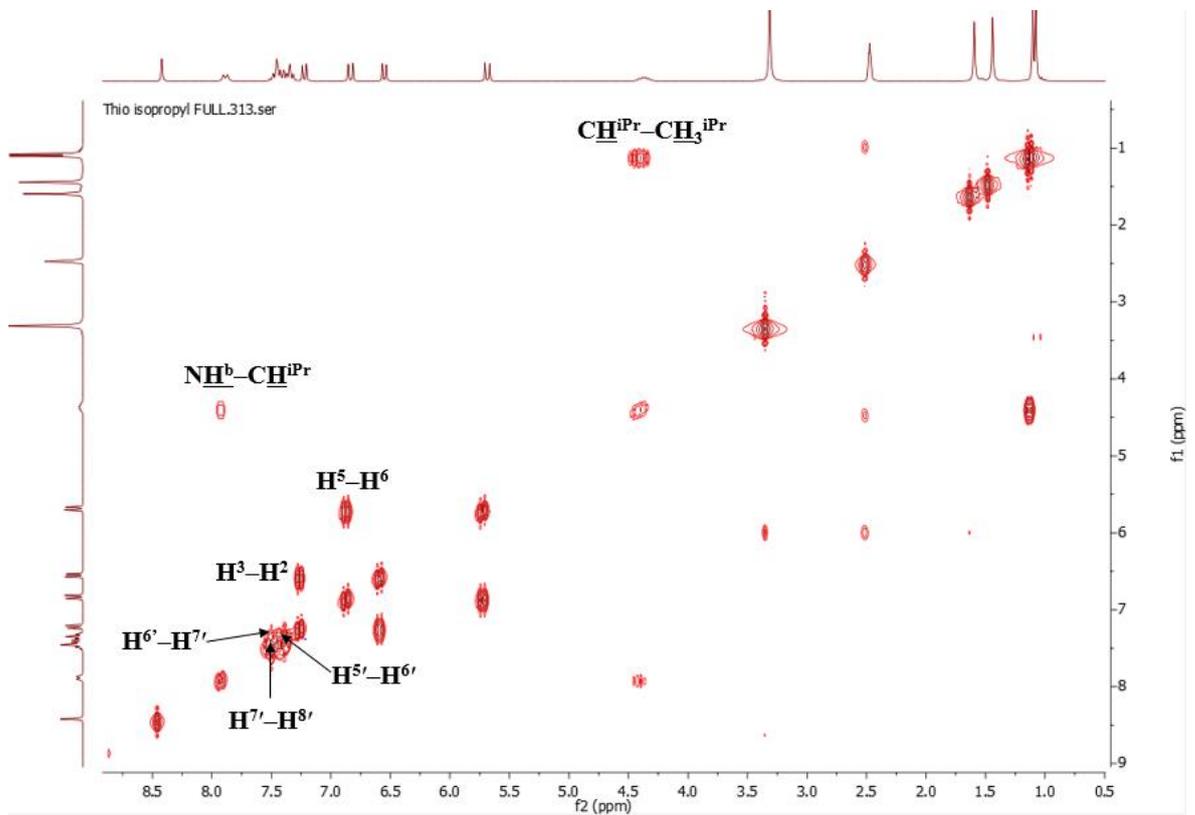


Рисунок 3.3. Спектр ^1H - ^1H COSY тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)
в ДМСО- d_6 .

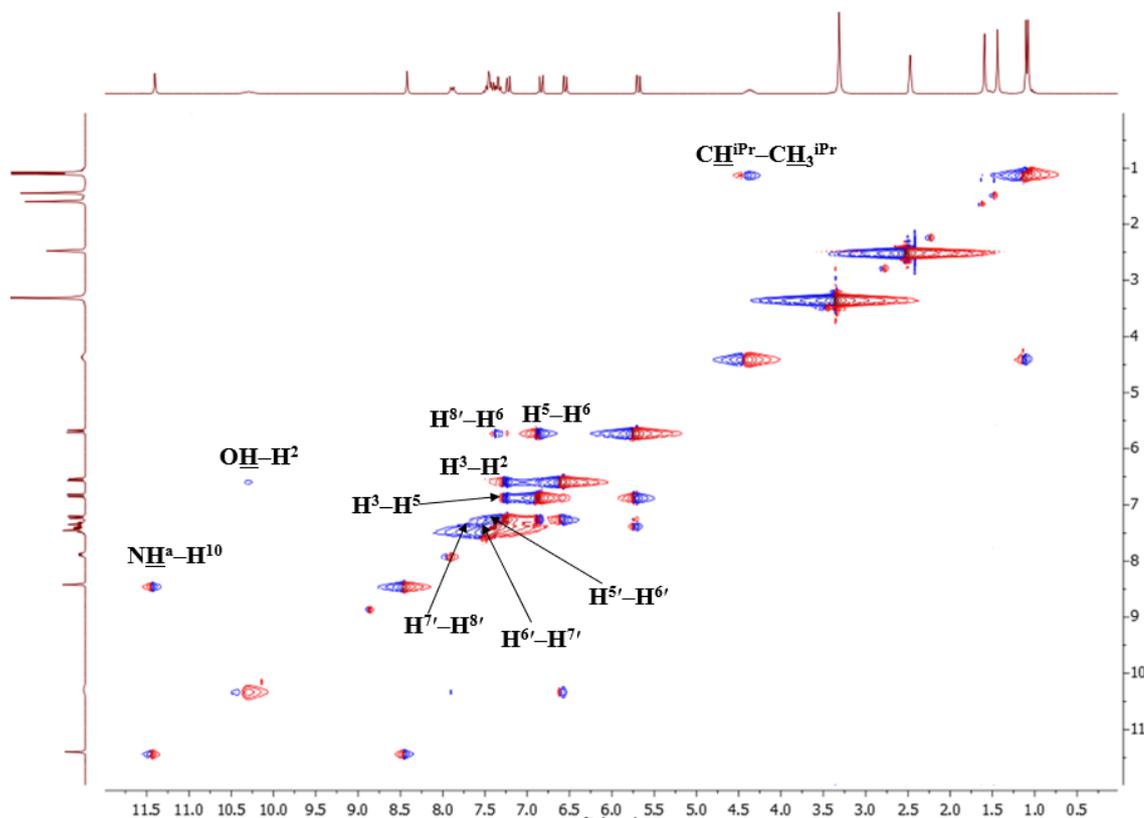


Рисунок 3.4. Спектр ^1H - ^1H NOESY тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)
в ДМСО- d_6 .

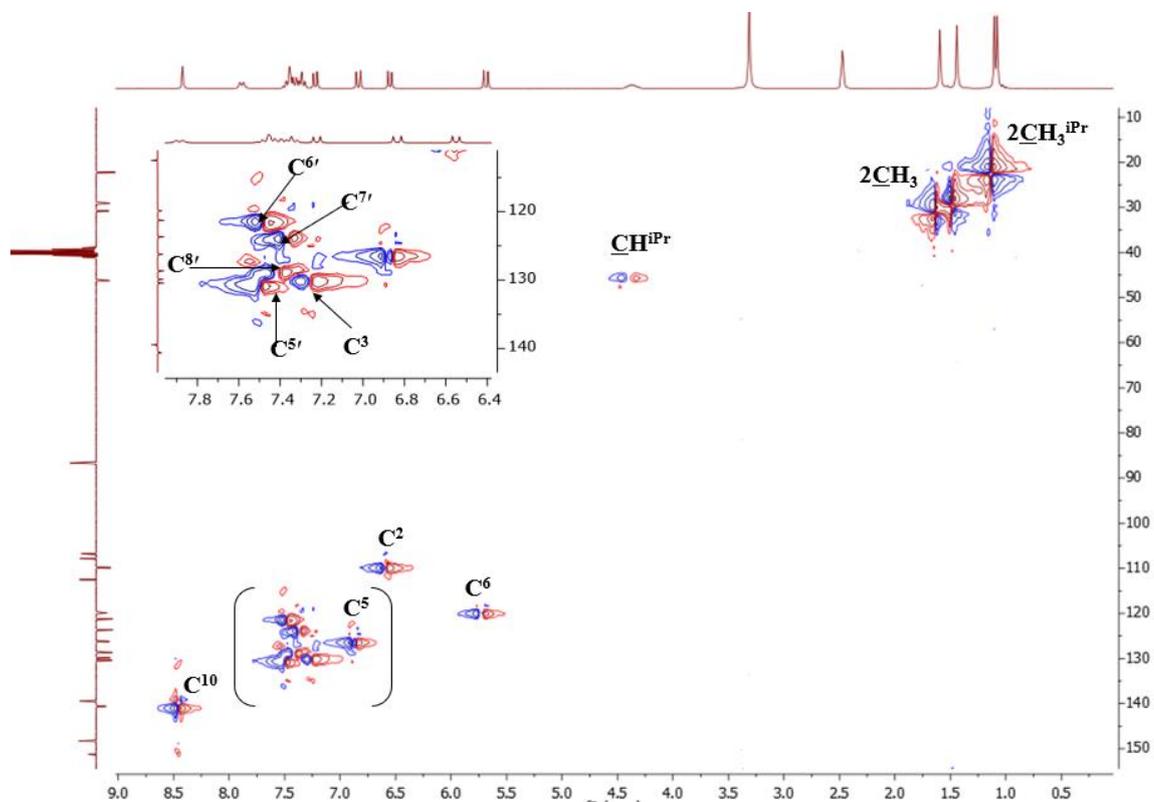


Рисунок 3.5. Спектр ^1H - ^{13}C HSQC тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)
в ДМСО- d_6 .

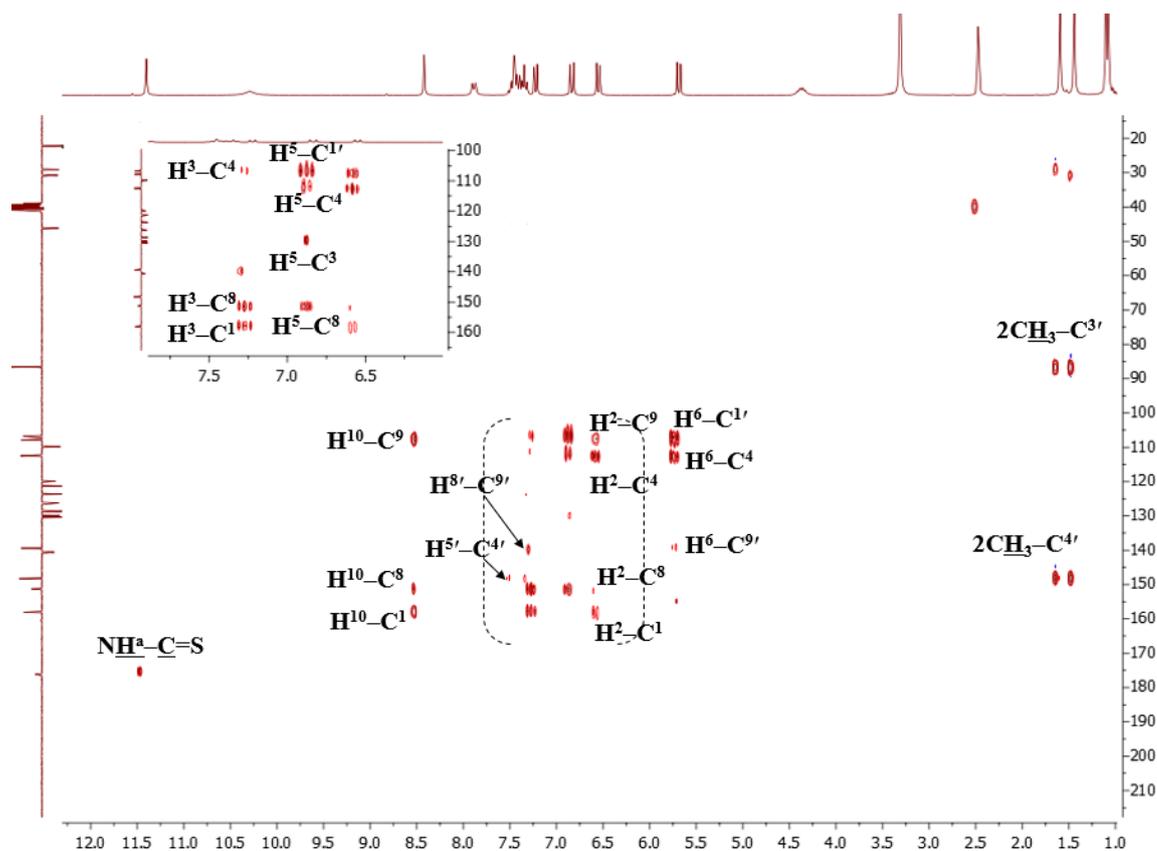


Рисунок 3.6. Спектр ^1H - ^{13}C НМВС тиосемикарбазона **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) в ДМСО- d_6 .

Спектр ^{13}C ЯМР соединения **Tn1** дает полное количество атомов углерода и имеет характерные сигналы, показывающие, что число атомов углерода и химический сдвиг пиков соответствуют ожидаемой структуре. Два атома углерода группы CH_3 изопробильного фрагмента наблюдаются в виде одного синглета в области 22.23 м.д. с большей интенсивностью, чем другие сигналы. Сигналы атомов углеродов двух метильных групп оксаинданового кольца проявляются в области 28.85 и 30.72 м.д. Сигнал атома углерода $\text{C}^{1'}$ в оксаиндановом кольце проявляется в области 106.78 м.д. Сигнал атомов углерода двойной связи $\text{C}^5=\text{C}^6$ пиранового кольца находится в области 126.23 (C^5) и 119.83 (C^6) м.д.

В спектре ^1H - ^1H COSY наблюдаются корреляционные сигналы между протонами групп: $\text{NH}^{\text{b}}-\text{CH}^{\text{iPr}}$, H^2-H^3 , H^5-H^6 , $\text{CH}^{\text{iPr}}-\text{CH}_3^{\text{iPr}}$ и между всеми парами ароматических протонов. Протоны H^2 и H^3 обнаруживаются при 6.55 м.д. и 7.22 м.д. соответственно ($J = 8.37$ Гц). Дублетные сигналы протонов винильных

фрагментов H^5 , H^6 обнаруживаются при 6.83 м.д. и 5.70 м.д., $J = 9.64$ Гц. В спектре 1H - ^{13}C НМВС тиосемикарбазона **Tn1** зарегистрированы дальнедействующие взаимодействия протона H^3 с атомами углерода C^4 , C^1 и C^8 (112.51, 158.07 и 151.22 м.д. соответственно). Для протона, связанного с атомом углерода C^{10} возникают дальнедействующие взаимодействия с атомом углерода C^9 (107.84 м.д.) и атомами углерода C^1 и C^8 (158.07 и 151.22 м.д. соответственно). Наличие корреляционного сигнала протонов H^6 и $H^{8'}$ в спектре 1H - 1H NOESY обусловлено близким пространственным расположением протонов в молекуле тиосемикарбазонов за счет ортогонального расположения оксаинданового и пиранового кольца. Основные взаимодействия 1H - 1H COSY, 1H - ^{13}C НМВС, и 1H - 1H NOESY тиосемикарбазона **Tn1** ($R=CH(CH_3)_2$) показаны на рисунках 3.7, 3.8.

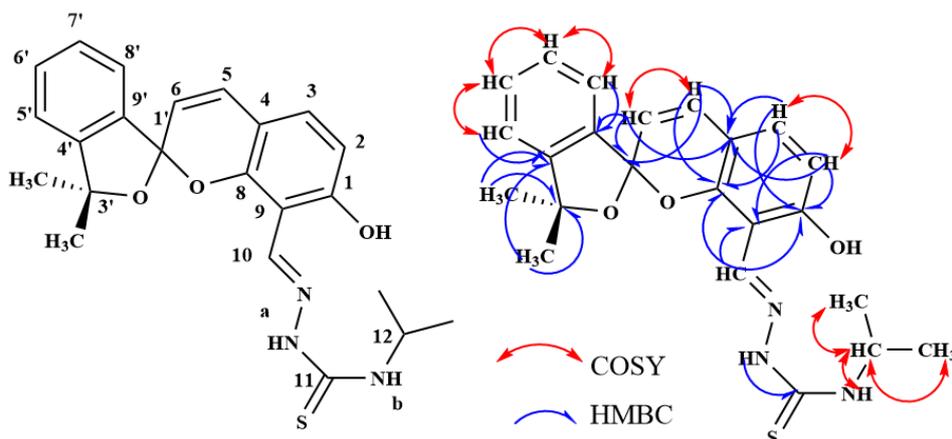


Рисунок 3.7. Химическая структура, основные взаимодействия в спектрах 1H - ^{13}C НМВС и 1H - 1H COSY тиосемикарбазона **Tn1** ($R=CH(CH_3)_2$).

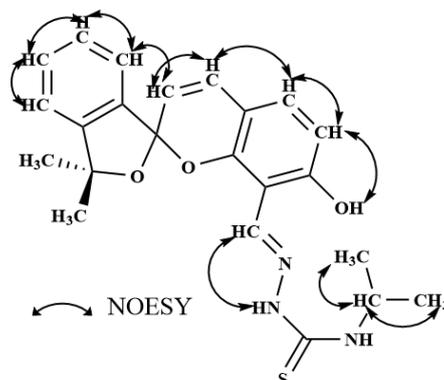


Рисунок 3.8. Основные взаимодействия в спектре 1H - 1H NOESY тиосемикарбазона **Tn1** ($R=CH(CH_3)_2$).

Электронные спектры поглощения тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** могут дать точную информацию, связанную с изомерией между “закрытой” и “открытой” формой молекулы, они также являются полезным инструментом для обозначения и контроля явлений связывания.

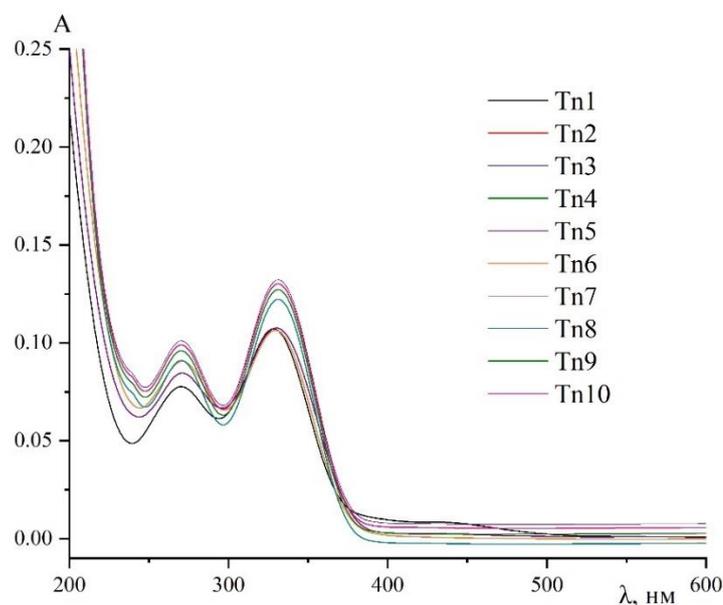


Рисунок 3.9. Электронные спектры поглощения растворов соединений **Tn(1–10)** в ацетонитриле, $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М, $T = 293$ К.

Процессы изомеризации и связывания, которые генерируют МС изомер в растворе, выделяются значительным изменением спектров поглощения соединений. В электронных спектрах тиосемикарбазонов в растворе ацетонитрила (рис. 3.9) присутствуют две несимметричные полосы поглощения в области 250–300 и 310–375 нм. Отсутствие полос поглощения в видимой области свидетельствует о том, что в процессе реакции образуются тиосемикарбазоны, в которых спиропирановый фрагмент находится в циклической или “закрытой” форме. Влияние заместителя R на положение максимумов полос поглощения незначительно. Для тиосемикарбазона **Tn1** наблюдается небольшое поглощение в области 400–500 нм, что, вероятно, связано с наличием в растворе небольшой доли “открытой” изомерной формы соединения.

3.1.2 Квантово-химические исследования

Исследуемые соединения способны образовывать различные изомерные структуры, наиболее устойчивые из них представлены на рис. 3.10.

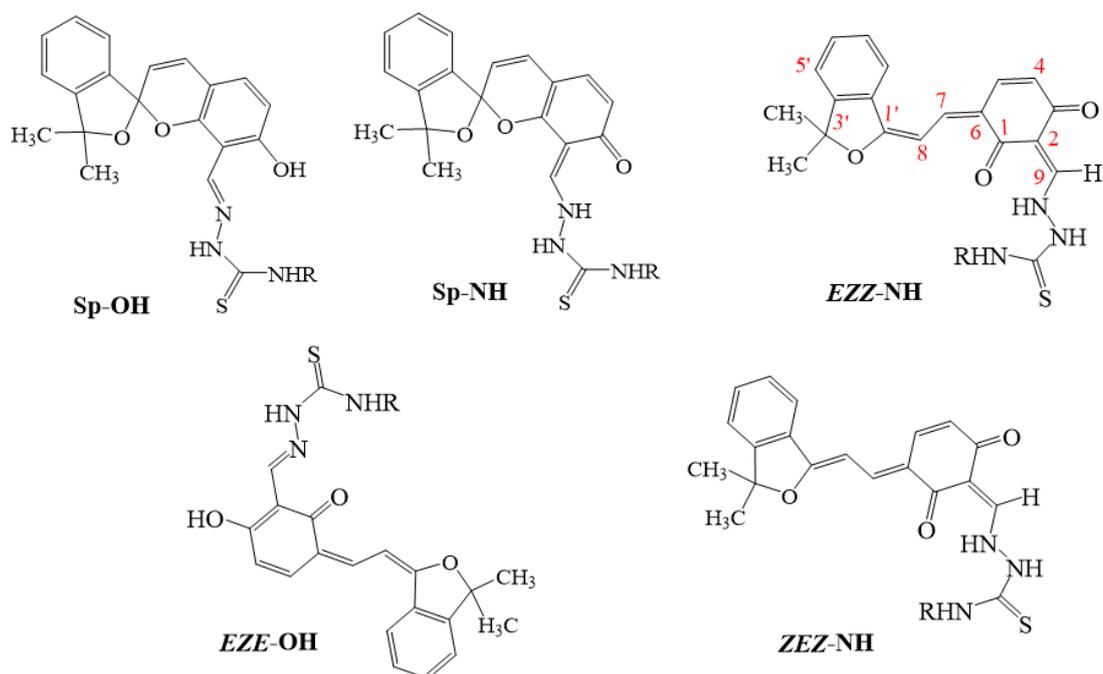


Рисунок 3.10. Строение изомерных форм тиосемикарбазонов **Tn(1–10)**.

Для получения более точного представления об относительной стабильности возможных изомерных форм исследуемых соединений, мы провели детальное исследование электронной структуры изомеров соединений **Tn(1–10)** методом квантово-химического моделирования (DFT) (B3LYP/6 311++G(d,p)). Моделирование проводилось в газовой фазе и в растворе ДМСО, в рамках приближения непрерывно поляризуемой среды (PCM).

Спироциклические формы обозначены как Sp-xH, где x = O или N, Sp-OH–бензойный и Sp-NH–хиноноидный изомер. Стереизомеры “открытой” формы обозначены как (Z-, E-типа) ууу-xH, где у = Z или E относительно трех двойных связей $C^8=C^{1'}$, $C^6=C^7$, и $C^2=C^9$, соответственно. Например, обозначение ZEZ-NH–показывает, что относительно связи $C^8=C^{1'}$ реализуется Z-конформация, относительно связи $C^6=C^7$ – E конформация, а относительно связи $C^2=C^9$ – Z конформация, протон связан с атомом азота аминогруппы. Возможные переходы между изомерами приведены на рис. 3.11.

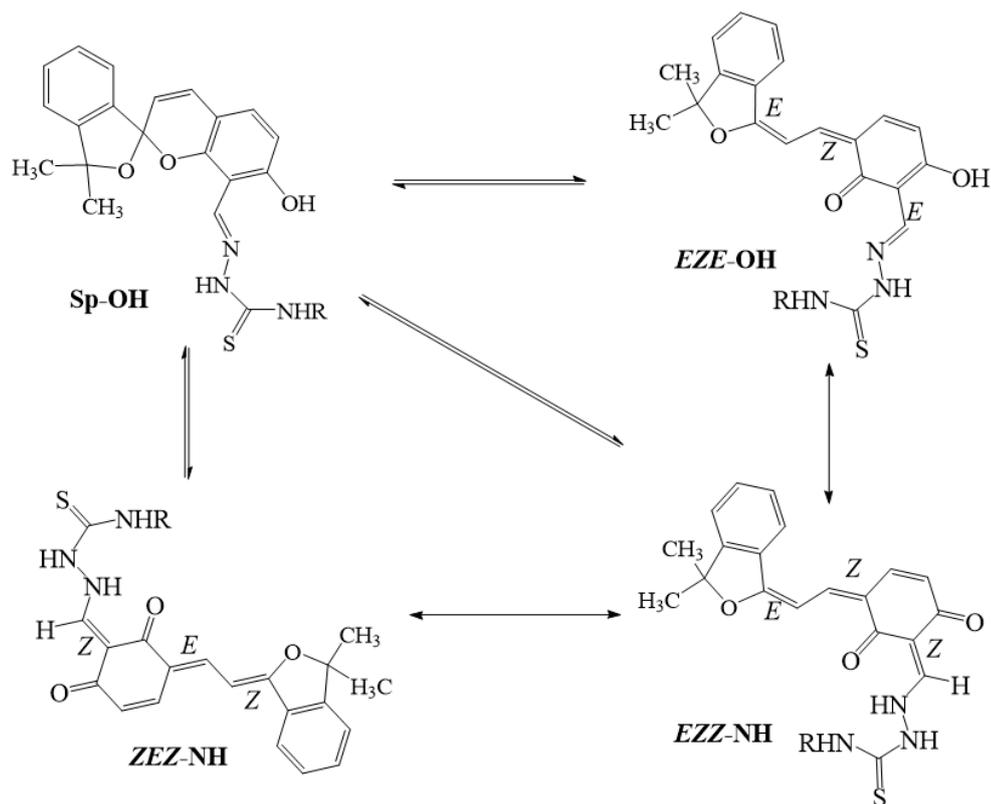


Рисунок 3.11. Обратимые превращения между четырьмя состояниями тиосемикарбазонов.

Расчитанные для газовой фазы (с поправкой на энергию нулевых колебаний (ZPE)) и раствора ДМСО значения относительной стабильности изомерных форм соединений **Tn(1–10)** приведены в таблице S3 Приложения. В газовой фазе “закрытая” форма тиосемикарбазонов Sp-OH, более стабильна, чем форма Sp-NH и “открытые” формы EZE, EZZ, ZEZ. Можно отмечено увеличение стабильности “закрытой” формы Sp-OH по сравнению с “открытой” формой в растворе ДМСО для тиосемикарбазонов, содержащих алифатические заместители. По данным расчетов, тиосемикарбазоны **Tn(4–7)**, содержащие ароматические углеводороды, непосредственно присоединенные к гидразидному фрагменту более устойчивы в “открытой” форме, что находится в противоречии с экспериментальными данными. Данное несоответствие может быть вызвано переоценкой вклада электростатического взаимодействия полярных мерацианиновых форм с растворителем в рамках модели непрерывной поляризуемой среды (PCM).

Для рационализации спектральных свойств соединений были выполнены расчеты TD-DFT для тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** (уровень теории B3LYP/6-311G(d)). Наиболее интенсивные расчетные переходы для изомеров типа Sp-OH соединений приведены в таблице S4 Приложения (для сравнения так же приведены данные расчета изомера ZEZ-NH соединения **Tn8**).

Спектры поглощения тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** имеют схожий характер. На рисунке 3.12 для примера приведен экспериментальный спектр соединения **Tn8** (красная сплошная линия) и рассчитанный методом TD-DFT линейчатый спектр.

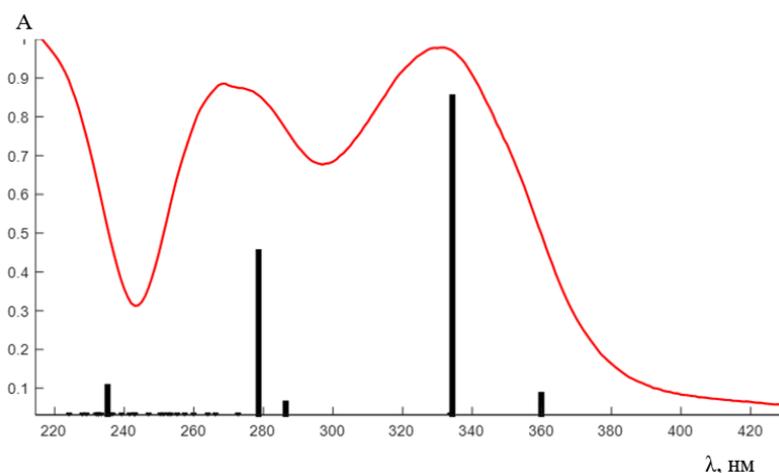


Рисунок 3.12. Экспериментальный (красная сплошная линия) и рассчитанный линейчатый (вертикальные линии) спектры тиосемикарбазона **Tn8**. Расчет методом TD-DFT (B3LYP/6-311G(d)).

В экспериментальном спектре тиосемикарбазона **Tn8** присутствуют две интенсивные полосы поглощения с максимумами в области 272 и 330 нм. По результатам моделирования, наиболее длинноволновая полоса поглощения определяется двумя электронными переходами. В области 359 нм имеет место переход ВЗМО→НСМО π - π^* , характеризующийся небольшой интенсивностью (рассчитанные формы молекулярных орбиталей приведены на рис. 3.13). Наибольшую интенсивность имеет переход в области 334 нм, преимущественно определяемый возбуждением n - π^* типа ВЗМО-1→НСМО. Положение второй экспериментальной полосы поглощения определяется переходом в пятое

возбужденное состояние, соответствующее одноэлектронному переносу ВЗМО→НСМО+1 в области 279 нм π - π^* типа.

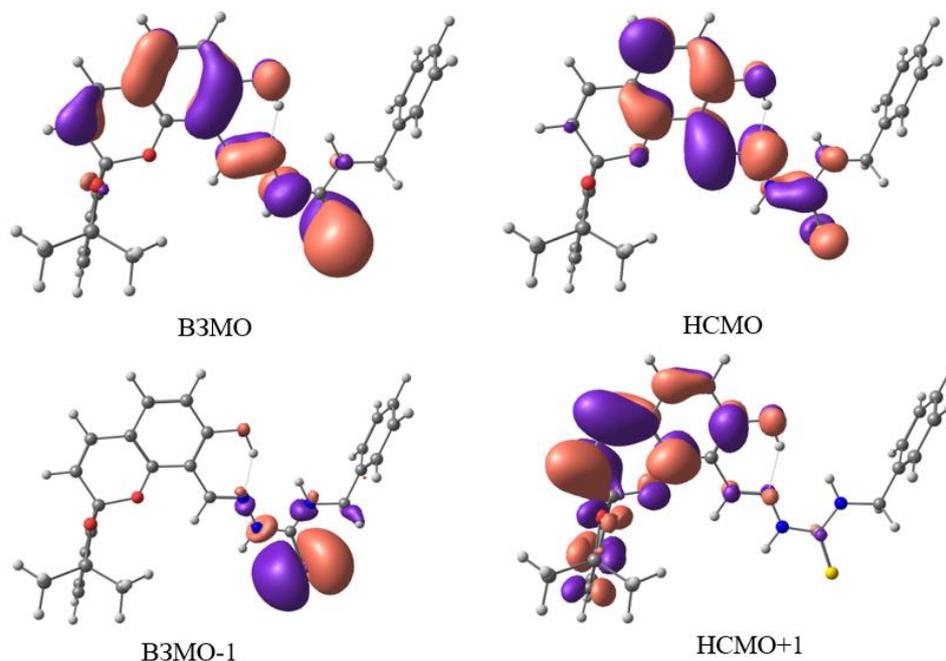
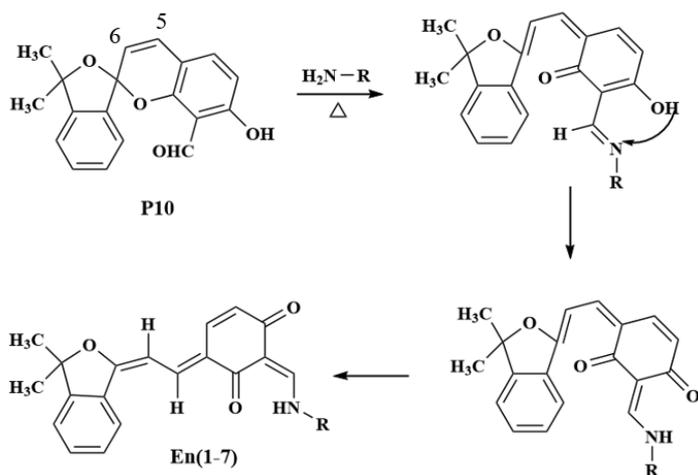


Рисунок 3.13. Граничные молекулярные орбитали изомера для тиосемикарбазона **Tn8** в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

Результаты квантово-химического расчета хорошо совпадают с характеристиками экспериментальных спектров поглощения тиосемикарбазонов **Tn(1–10)**.

3.2 Енаминокетоны



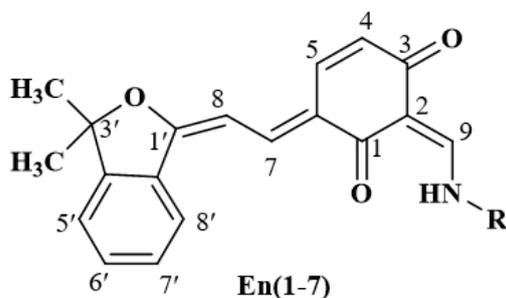
В отличие от тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** при конденсации спиропирана **P10** с первичными или ароматическими и алифатическими аминами были получены енаминокетоны **En(1–7)** [169, 170]. Процесс образования

Рисунок 3.14. Образование енаминокетонов.

енаминокетонов из спиропирана **P10** можно объяснить на рисунке 3.14.

При взаимодействии спиропирана **P10** с первичным амином происходит самопроизвольный процесс раскрытия спиропирановый кольца с разрывом Csp^3-O связи, и одновременным 1,5-сигматропным сдвигом протона ОН группы на атома азота азометинового фрагмента. Далее в результате вращения пиранового фрагмента вокруг центральной $H^5C=CH^6$ связи образуется плоский мероцианин (*Z-E*-изомеризация). В растворе в состоянии равновесия одновременно сосуществуют несколько изомерных мероцианиновых форм. “Открытая” форма енаминокетонов имеет множество возможностей к изомеризации за счет вращения вокруг трех двойных связей мероцианинового и азометинового фрагментов.

Структурные особенности, способность образовывать комплексы с ионами металлов и биологическая активность ряда енаминокетонов **En(1–7)** представлены ниже:



- 1, R = $(CH_2)_2OH$
- 2, R = $CH(CH_3)_2$
- 3, R = $C(CH_3)_3$
- 4, R = *n*-толил
- 5, R = 3,4-диметилфенил
- 6, R = 4-нитрофенил
- 7, R = 2,3-дихлорфенил

3.2.1 Результаты структурных исследований методами ИК, ЯМР спектроскопии и электронной спектроскопии

Успешный синтез енаминакетонов можно подтвердить, объединив информацию, полученную из ИК-спектроскопии и ЯМР спектроскопии (одномерной ЯМР и двумерной гетероядерной ЯМР). ИК-спектры образцов твердых порошков **En(1–7)** свидетельствуют об “открытой” изомерной структуре енаминокетонов из-за наличия характерного для валентных колебаний связи $C=O$ поглощения в области $1640-1649\text{ см}^{-1}$. Валентные колебания связи $N-H$ смещены в сторону более низких частот и

регистрируются в области 3047–3075 см^{-1} за счет сильной внутримолекулярной водородной связи $\text{NH}\cdots\text{O}$. ИК спектроскопия также показала наличие в структуре енаминокетона **En1** ($\text{R}=(\text{CH}_2)_2\text{OH}$) ОН группы, которая проявляется в области около 3232 см^{-1} . Кроме того, группа NO_2 в соединении **En6** ($\text{R}=4$ -нитрофенил) приводит к наличию поглощения 1523 см^{-1} антисимметричного группового колебания и 1321 см^{-1} симметричного валентного колебания нитрогруппы, а связь $\text{C}-\text{Cl}$ в соединении **En7** ($\text{R}=2,3$ -дихлорфенил) характеризуется полосой поглощения 862 см^{-1} . Ниже приведена таблица характеристических полос ИК-поглощения для соединений **En(1–7)** (Таблица 2).

Таблица 2. Данные ИК спектров енаминокетонов **En(1–7)**.

Соед.	R	ν_{OH}	$\nu_{\text{C}-\text{Cl}}$	$\nu_{\text{NO}_2}^*$	ν_{NH}	ν_{CH}	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$
En1	$(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	3232	-	-	3065	2852	1645
En2	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	-	-	-	3047	2869	1645
En3	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	-	-	-	3052	2872	1640
En4	<i>n</i> -толил	-	-	-	3047	2869	1649
En5	3,4-диметилфенил	-	-	-	3045	2857	1646
				c: 1321			
En6	4-нитрофенил	-	-	ас: 1523	3075	2926	1649
En7	2,3-дихлорфенил	-	862	-	3074	2866	1640

*с: симметричное валентное колебание; ас: антисимметричное валентное колебания NO_2 группы.

В спектрах ^1H ЯМР соединений **En(1–7)** в растворе ДМСО наблюдается суперпозиция нескольких перекрывающихся наборов сигналов с различной интенсивностью из-за динамического равновесия нескольких изомеров. Два набора сигналов являются наиболее интенсивными и относятся к изомерам, представленным на рисунке 3.15 как *E* и *Z* изомеры относительно связи $\text{C}^2=\text{C}^9$.

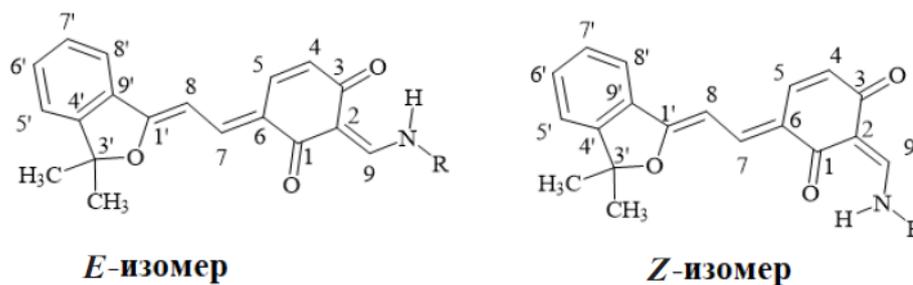


Рисунок 3.15. Основные изомеры енаминокетонов в растворе ДМСО.

Другие наборы сигналов имеют относительно низкую интенсивность. Мольная доля этих изомеров для енаминокетонов **En(1–7)** в растворе ДМСО по данным ^1H ЯМР спектров представлена в таблице 3:

Таблица 3. Соотношение между двумя основными изомерными формами енаминокетонов **En(1–7)**.

Соед.	R	Глав. изомер (%)	Мино. изомер(%)
En1	$(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	60	40
En2	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	65	35
En3	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	55	30
En4	<i>n</i> -толил	60	30
En5	3,4-диметилфенил	60	40
En6	4-нитрофенил	56	43
En7	2,3-дихлорфенил	60	30

Различные соотношения двух основных изомерных форм указывают на разную относительную стабильность енаминокетонов. В случае соединений **En1**, **En5** и **En2** не наблюдаются сигнала других изомеров соотношение главных и минорных изомеров = 60:40 (для **En1** и **En5**) и 65:35 (**En2**) соответственно. Для соединения **En3** зарегистрировано соотношение изомеров 55:30, при этом наблюдаются сигналы как минимум от четырех изомерных форм. Для производного **En4** и **En7** соотношение двух основных форм в растворе ДМСО составляет 60:30, около 10% приходится на другие конформеры.

Характеристики ^1H ЯМР спектров енаминокетонов в растворе ДМСО- d_6 приведены в таблице S5 Приложения. В спектрах соединений **En(1–7)** протоны от двух метильных групп изобензофуранового фрагмента проявляются в виде одного синглета с интенсивностью 6H в области 1.62–1.67 м.д., что свидетельствует о том, что исследуемые соединения в растворе присутствуют в виде плоских изомеров в енаминокетонной или “открытой” форме. В ^1H ЯМР спектрах спиропирана **P10** и тиосемикарбазонов **Tn(1–10)**, в отличие от спектров **En(1–7)**, метильные группы не являются магнитно эквивалентными и дают два синглетных сигнала интенсивностью 3H каждый в диапазоне 1.44–

1.47 и 1.59–1.66 м.д. (на рис. S1 и в табл. S2 Приложения). Кроме того, наличие и форма дублетных сигналов от протонов NH группы с центром тяжести $\delta = 11.34\text{--}14.08$ м.д. подтверждает существование изомеров **En(1–7)** в енаминокетонной форме. Как видно из данных таблицы S5 Приложения, наибольшие изменения химических сдвигов двух изомеров наблюдаются для NH-протона ($\Delta = 0.29\text{--}0.38$ м.д.) и протона азометиновой CH=N группы ($\Delta = -0.15\text{--}-0.02$ м.д.). Это также указывает на наличие в растворе *Z*- и *E*-конформерных форм вокруг экзоциклической связи C²=C⁹, которые стабилизированы внутримолекулярной водородной связью между NH-группой и одной из двух оксогрупп.

В ¹H ЯМР спектрах *Z*-енаминокетонов NH-протоны зарегистрированы в области 11.63–14.08 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия $J_{\text{NH},\text{C}^9\text{H}} = 12.40\text{--}14.20$ Гц. Сигналы NH-протонов *E*-изомеров немного сдвинуты в область сильного поля и проявляются при 11.34–13.79 м.д. Протоны C⁹H-группы енаминакетонов **En(1–3)**, образующегося из алифатических аминов, зарегистрированы в виде дублетов в области 8.23–8.30 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия $J_{\text{NH},\text{C}^9\text{H}} = 12.20\text{--}14.10$ Гц в *Z*-изомерах. Соответствующие сигналы *E*-изомеров сдвинуты в сторону слабого поля и проявляются при 7.28–8.35 м.д.

В тоже время сигнал протона H⁷ в фрагменте =C⁸H–C⁷H= наблюдается для обоих изомерных енаминокетонов *E* и *Z*. Сигналы протонов H⁷ представляют собой дублеты дублетов (при 8.10 м.д. со значениями константы $J_{\text{H}^7,\text{H}^8} = 13.3\text{--}13.4$ Гц). Протоны H⁷, H⁸ зарегистрированы в виде дублета дублетов за счет изомерии. Протоны H⁵ циклогексадионного фрагмента наблюдаются в виде отдельных дублетов в диапазоне 7.79–8.12 м.д. Тогда как H⁴ протоны обнаружены в диапазоне 5.92–6.12 м.д. ($J_{\text{H}^5,\text{H}^4} = 10.0\text{--}10.1$ Гц). Сигналы от ароматических протонов изобензофуранового фрагмента зарегистрированы в области 7.29–8.24 м.д. с небольшой разницей между соответствующими *Z*- и *E*-изомерами.

В ^{13}C ЯМР спектрах енаминокетонов сигналы атомов углерода $\text{C}^{1'}$ в спирокольце появляются в области 165.08–166.82 м.д. Сигналы атомов углеродов двух метильных групп спирокольца проявляются в области 20.95–27.86 м.д. Сигналы атомов углерода двойной связи $\text{C}^4=\text{C}^5$ пиранового кольца показаны в области 122.89–123.89 и 135.35–137.15 м.д., соответственно. Наибольшее изменение значений химического сдвига между изомерами наблюдается для сигнала ядра C^3 (2.66–2.96 м.д.), сигнала ядра C^1 (1.86–2.09 м.д.) и C^7 (около 0.62–0.7 м.д.). В главном компоненте раствора химические сдвиги ядер C^1 и C^3 практически одинаковы, но в минорном компоненте сигнал C^1 смещен в более сильное поле, а C^3 - смещен в более слабое поле.

Конформация *Z* вокруг двойной связи $\text{C}^8=\text{C}^{1'}$ подтверждается наличием кросс-пика между ядрами H^8 и $\text{H}^{8'}$ в спектрах ^1H - ^1H NOESY соединений. Конфигурацию *E* по отношению к двойной связи $\text{C}^6=\text{C}^7$ подтверждает наблюдение кросс-пика NOESY для пары ядер H^5 - H^8 .

Для точного отнесения сигналов в спектре ^1H ЯМР енаминокетонов использовали ^1H - ^1H COSY и ^1H - ^1H NOESY спектры, а отнесение сигналов в спектре ^{13}C ЯМР выполняли с помощью данных спектров ^1H - ^{13}C HSQC и ^1H - ^{13}C HMBC. Для примера приведены спектры соединения **En4** ($\text{R}=\textit{n}$ -толил): ^1H ЯМР (рис. 3.16), ^{13}C ЯМР (рис. 3.17), ^1H - ^1H COSY (рис. 3.18), ^1H - ^1H NOESY (рис. 3.19), ^1H - ^{13}C HSQC (рис. 3.20) и ^1H - ^{13}C HMBC (рис. 3.21).

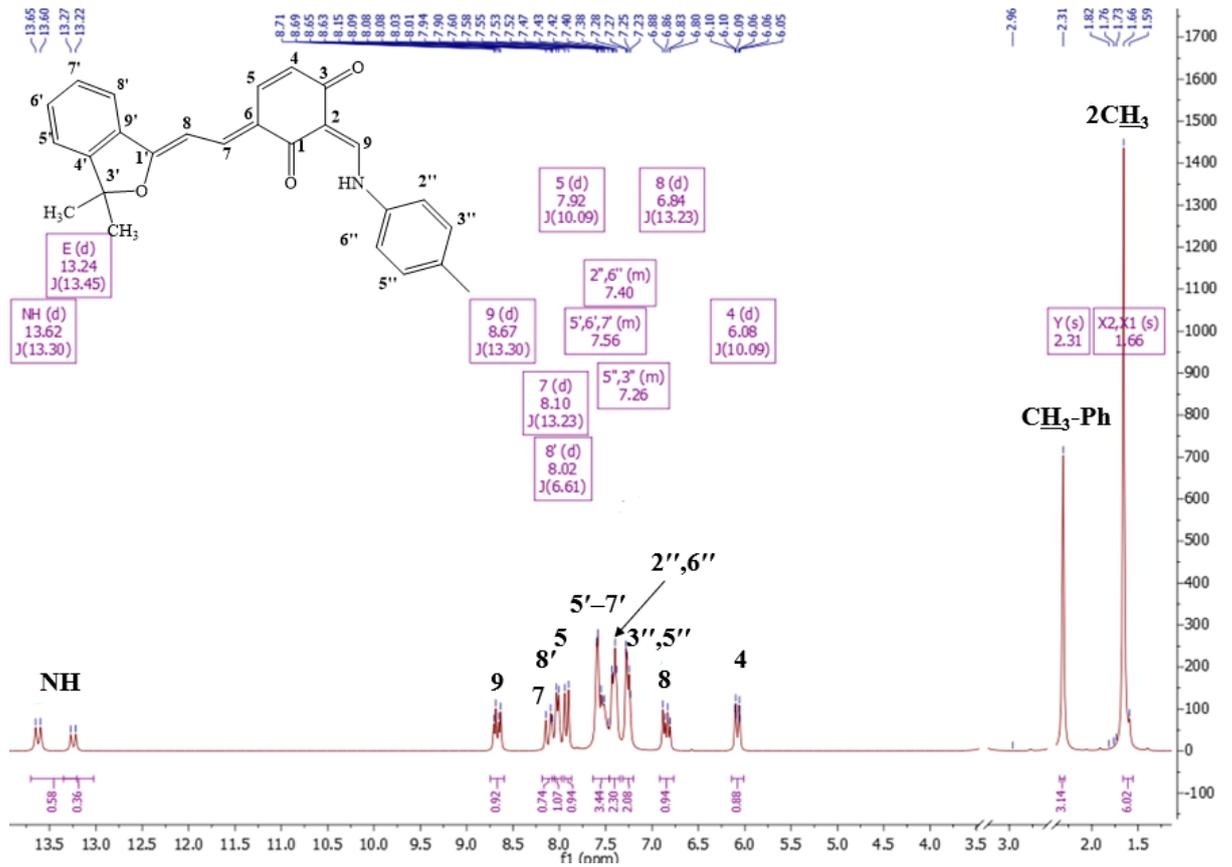


Рисунок 3.16. Спектр ^1H ЯМР енаминокетона **En4** в $\text{DMSO}-d_6$ (на спектре приведены характеристики сигналов только основного компонента раствора).

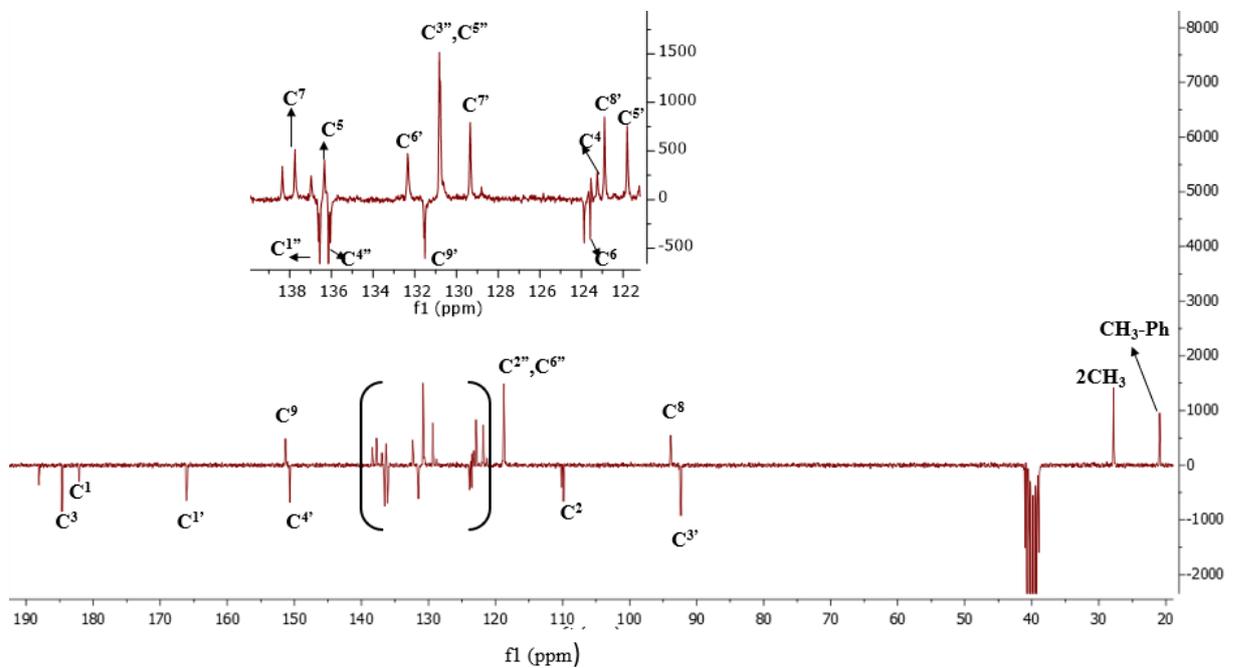


Рисунок 3.17. Спектр ^{13}C ЯМР енаминокетона **En4** ($\text{R}=\textit{n}$ -толил) в $\text{DMSO}-d_6$.

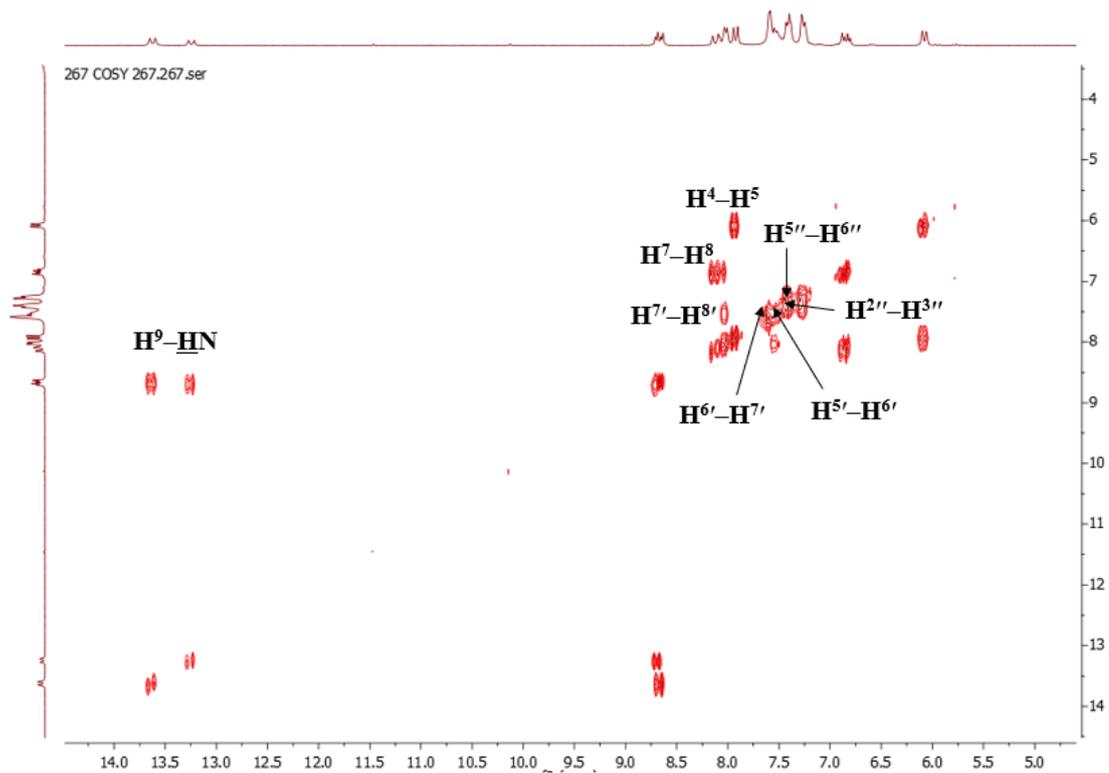


Рисунок 3.18. Спектр ^1H - ^1H COSY енаминокетона **En4** ($R=n$ -толил) в ДМСО- d_6 .

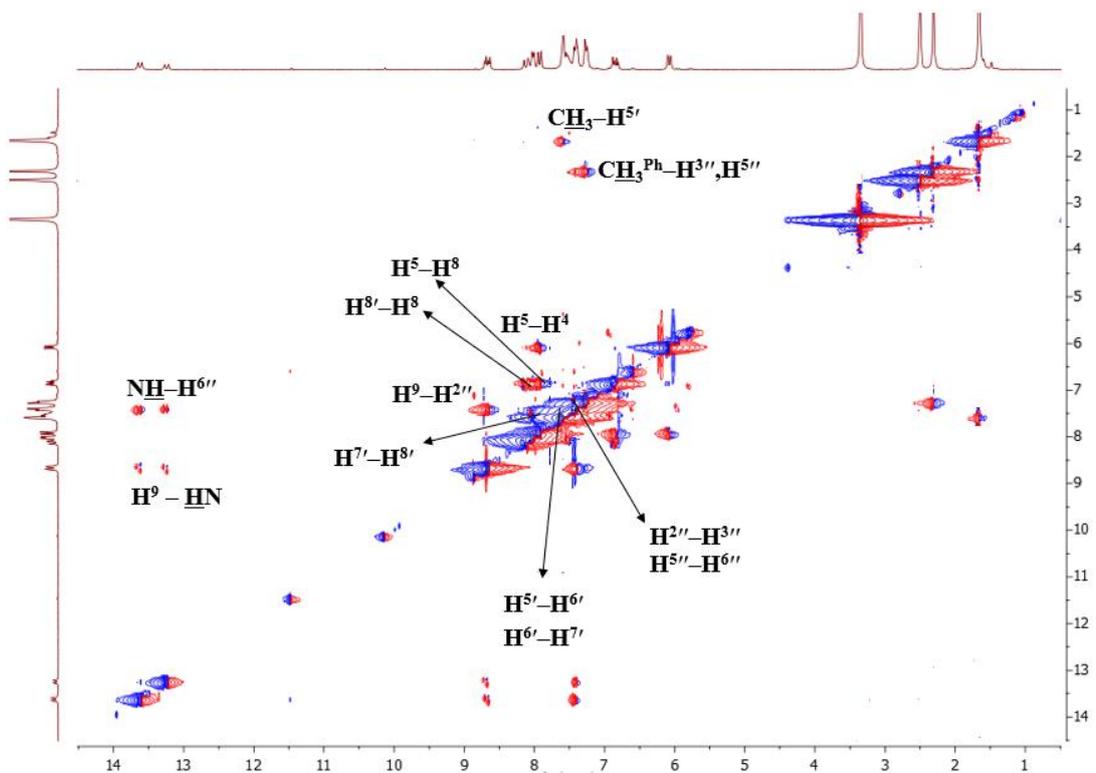


Рисунок 3.19. Спектр ^1H - ^1H NOESY енаминокетона **En4** ($R=n$ -толил) в ДМСО- d_6 .

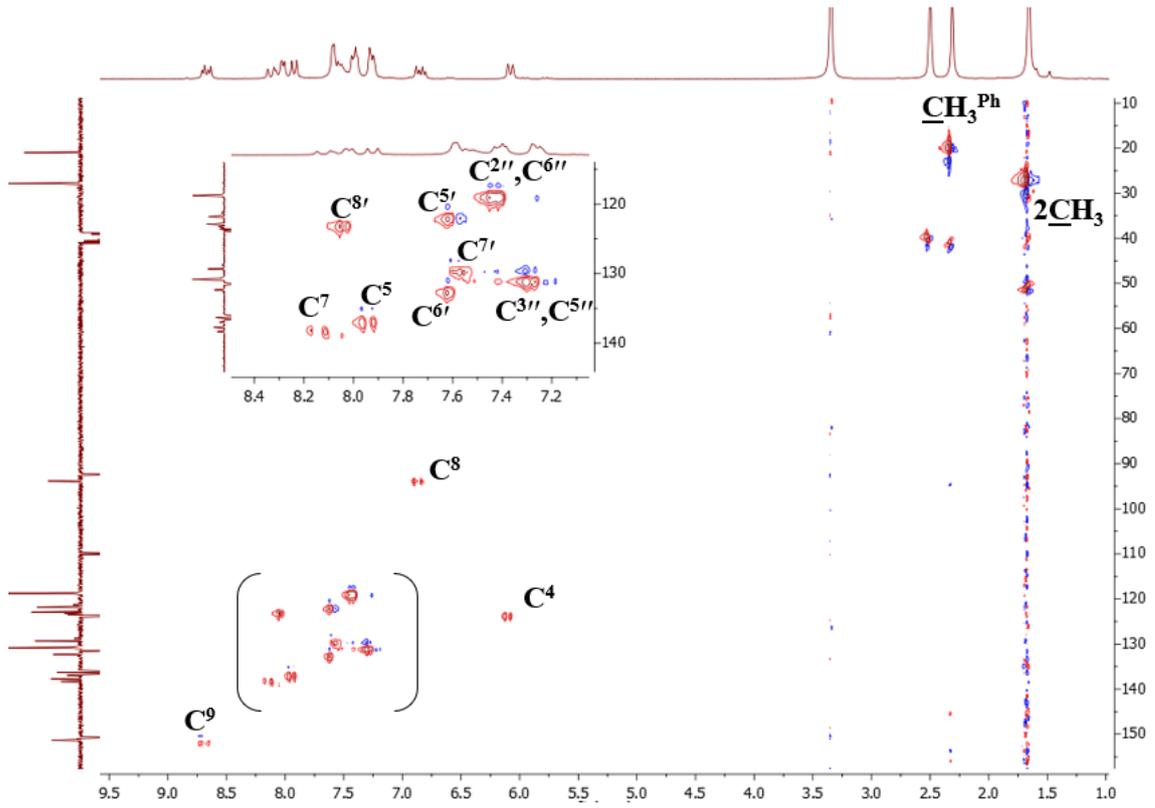


Рисунок 3.20. Спектр ^1H - ^{13}C HSQC енаминокетона **En4** ($\text{R}=\textit{n}$ -толил) в ДМСО- d_6 .

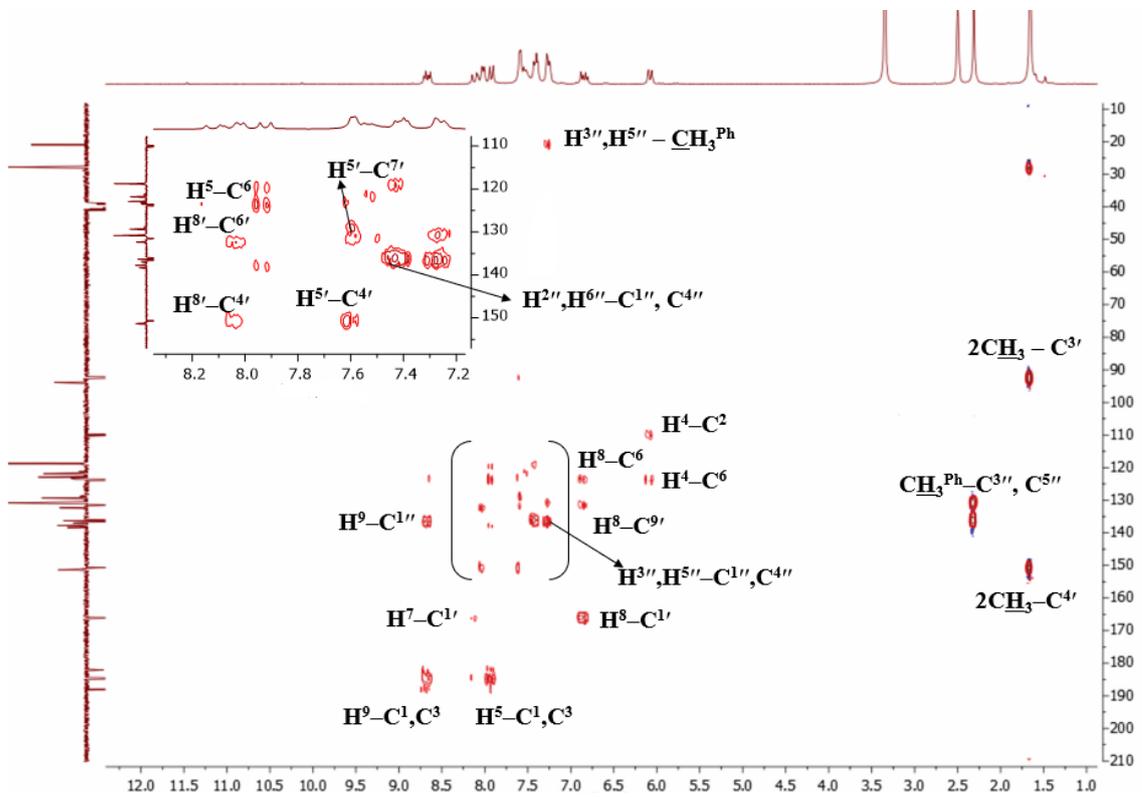


Рисунок 3.21. Спектр ^1H - ^{13}C НМВС енаминокетона **En4** ($\text{R}=\textit{n}$ -толил) в ДМСО- d_6 .

Как и в случае с другими енаминокетонами, данные спектров ^1H ЯМР показывают, что в растворе соединения **En4** существует динамическое равновесие изомеров, на приведенных спектрах проиндексированны только сигналы основного изомера. В спектре ^1H ЯМР присутствуют характеристические сигналы протонов, как показано в таблице S5 Приложения; сигнал двух метильных групп оксаинданового кольца (6H, $\delta\text{H} = 1.66$ м.д.), одной метильной группы *n*-толильного фрагмента (3H, $\delta\text{H} = 2.31$ м.д.). Также наблюдаются сигналы H^7 – H^9 протонов. Кроме того, в области ароматических протонов наблюдаются значительное количество перекрывающихся сигналов, что затрудняет их отнесение. Помимо сигнала протона NH группы около 13.62 м.д., рядом с ним при 13.24 м.д. появляются сигналы атомов водорода NH группы *E* изомера меньшей интегральной интенсивности.

При проведении исследования методом ^{13}C ЯМР енаминокетона **En4** в спектре было обнаружено удвоение числа сигналов атомов углерода, что подтверждает наличие двух изомеров (рисунок 3.17). В спектре ^1H - ^{13}C HMBC енаминокетона **En4** зарегистрированы дальнедействующие взаимодействия протона атома углерода C^9 с атомами углерода $\text{C}^{1''}$, C^1 , и C^3 (136.14, 182.07, и 184.67 м.д. соответственно). Для протона H^8 возникают дальнедействующие взаимодействия с атомом углерода $\text{C}^{1'}$ (166.12 м.д.) и атомами углерода C^6 и $\text{C}^{9'}$ (123.58 и 131.51 м.д. соответственно).

Основные взаимодействия ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, и ^1H - ^1H NOESY енаминокетона **En4** показаны на рисунках 3.22, 3.23.

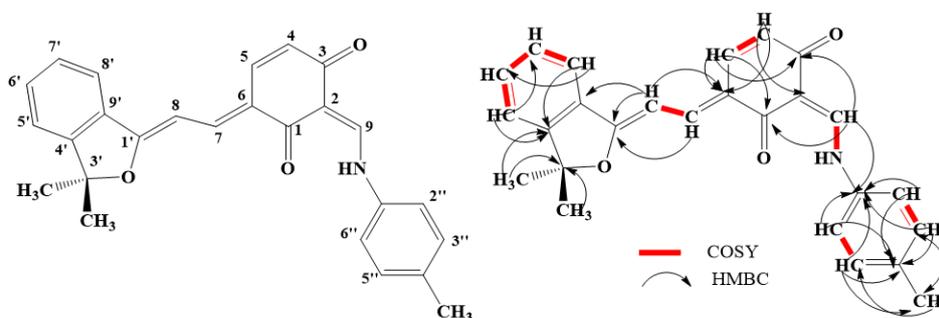


Рисунок 3.22. Химическая структура, основные взаимодействия в спектрах ^1H - ^{13}C HMBC и ^1H - ^1H COSY енаминокетона **En4**.

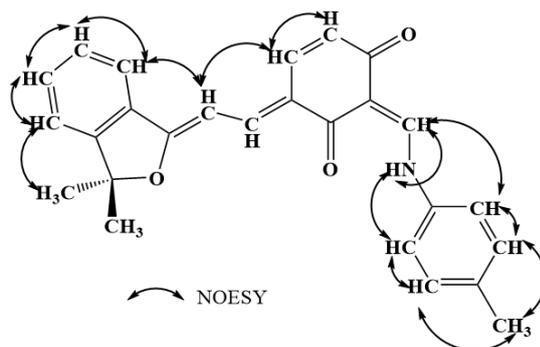


Рисунок 3.23. Основные взаимодействия в спектре ^1H - ^1H NOESY
енаминокетона **En4**.

В электронных спектрах поглощения енаминокетонов **En(1–7)** в растворе ацетонитрила (рис. 3.24) присутствуют высокоинтенсивные широкие асимметричные полосы поглощения в области 300–550 нм.

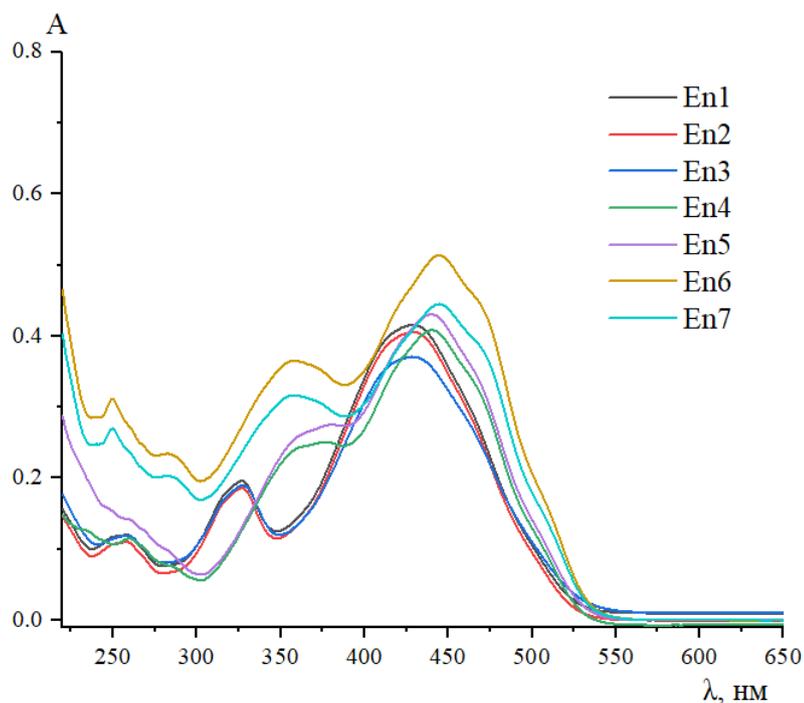


Рисунок 3.24. Электронные спектры поглощения растворов енаминокетонов в ацетонитриле, $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М, $T = 293$ К.

Модификация заместителя R приводит к небольшому сдвигу максимумов полос поглощения енаминокетонов. Для енаминокетонов **En(1–3)** – продуктов конденсации с алифатическими аминами, максимум поглощения располагается при 429 нм. В спектрах поглощения соединений **En(6, 7)**, содержащих электроноакцепторные заместители в фенильном фрагменте, появляются два

пика поглощения при 355–356 и 443–444 нм. В то время как в случае соединений **En(4, 5)**, содержащих электронодонорные заместители в фенильном фрагменте, появляются два максимума поглощения при 365–366 и 434–439 нм. Наличие интенсивных полос поглощения в видимой области придает раствору енаминокетонов темно-красный цвет и косвенно свидетельствует о реализации в растворе “открытой” изомерной формы.

3.2.2 Квантово-химические исследования

Для более глубокого понимания относительной стабильности возможных изомерных форм синтезированных соединений проведено детальное исследование электронной структуры изомеров соединений **En(1–7)** методом DFT. Исследуемые соединения могут образовывать большое разнообразие изомерных структур. Некоторые из наиболее важных структур для этого исследования и их условные обозначения показаны на рис. 3.25. Обозначены изомеры аналогично описанному для тиосемикарбазонов.

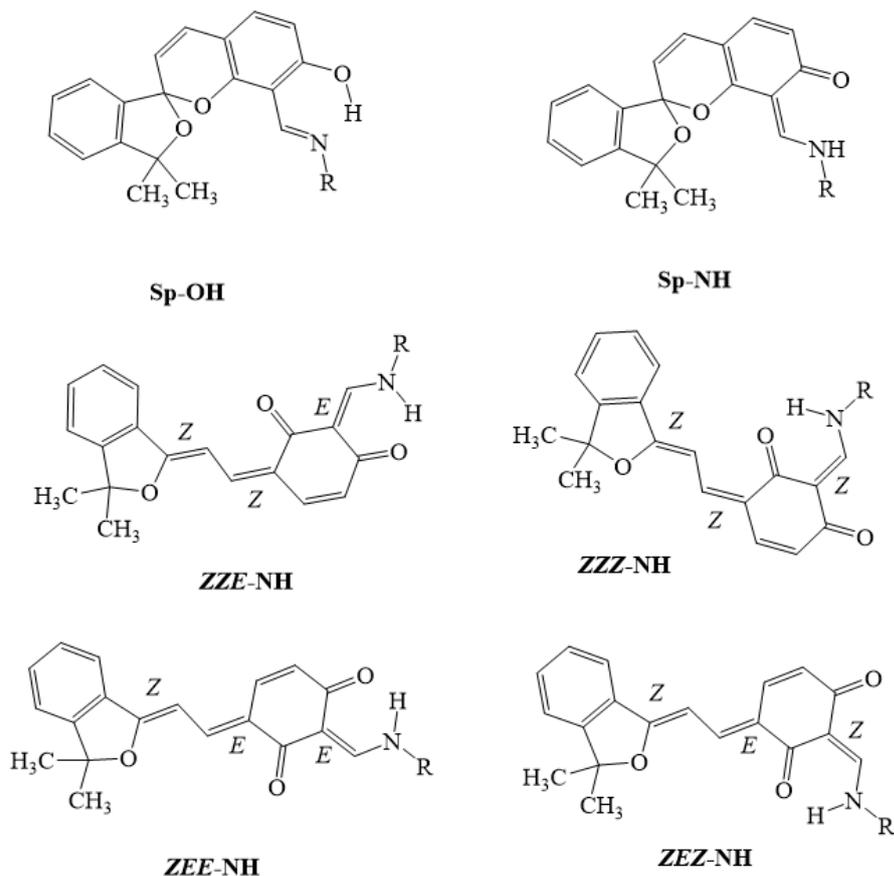


Рисунок 3.25. Изомеры енаминокетонов и их обозначения.

Рассчитанные для газовой фазы (с поправкой на энергию нулевых колебаний (ZPE)) и раствора ДМСО значения относительной стабильности изомерных форм **En(1–7)** приведены в таблице S6 Приложения. Как с учетом, так и без учета эффектов сольватации для всех соединений предпочтительной оказывается енаминокетонная форма. Рассчитанная энергия дестабилизации спироизомеров значительно выше в растворе, чем в газовой фазе, за счет стабилизации более полярных енаминокетонов в полярном растворителе. Для спироизомеров в газовой фазе бензоидный таутомер (Sp-OH) более стабилен, чем хиноноидный (Sp-NH), но в растворе ДМСО относительная стабильность обратная. В случае енаминокетонов, образующихся из ароматических аминов как в газовой фазе, так и в растворе ДМСО, изомеры типа Sp-OH более стабильны, чем Sp-NH.

Электронные спектры поглощения енаминокетонов **En(1–7)** значительно отличаются от спектров соединений **Tn(1–10)**. В экспериментальных спектрах поглощения соединений **En(1–7)** наблюдается высокоинтенсивная несимметричная полоса поглощения в области 300–550 нм. Для рационализации спектральных свойств енаминокетонов были выполнены расчеты TD-DFT для четырех соединений **En(1–3, 7)** (уровень теории B3LYP/6-311G(d)). Наиболее интенсивные расчетные переходы для изомеров *ZEE-NH* и *ZEZ-NH* соединений приведены в таблице S7 Приложения (для сравнения так же приведены расчетные данные для изомера Sp-OH соединения **En1**). На рисунке 3.26 для примера приведен экспериментальный спектр соединения **En1** (желтая сплошная линия) и рассчитанные методом TD-DFT линейчатые спектры двух изомеров *-ZEZ-NH* и *ZEE-NH*, присутствующие в растворе по данным спектроскопии ¹H ЯМР (красные вертикальные линии соответствуют рассчитанному спектру изомера *ZEE-NH*, а зеленные – спектру изомера *ZEZ-NH*).

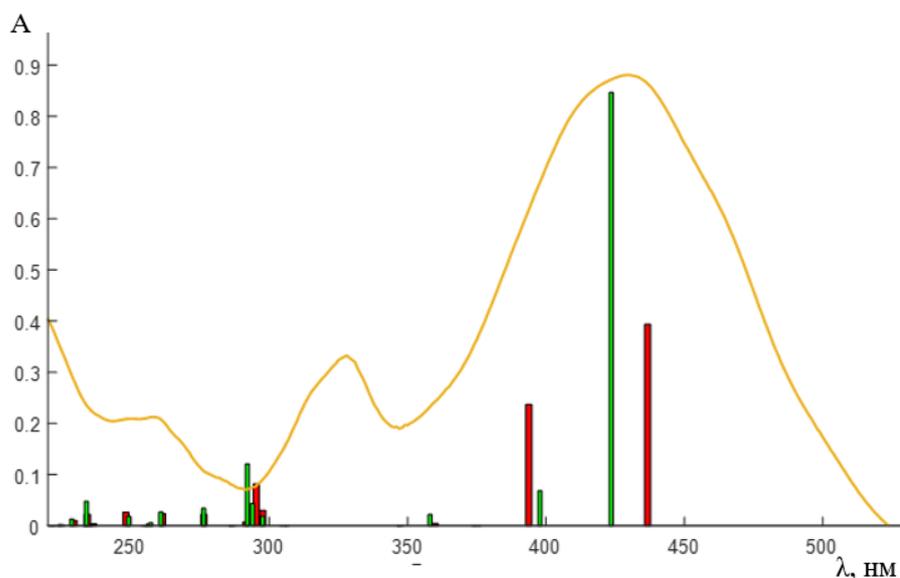


Рисунок 3.26. Экспериментальный (желтая сплошная линия) и линейчатый теоретический (вертикальные линии) спектры енаминокетона **En1**. Красные вертикальные линии – *ZEE-NH*, зеленые – *ZEZ-NH* изомер (соотношение интенсивностей 40:60, соответственно). Расчет методом TD-DFT (B3LYP/6-311G(d)).

Рассчитанные формы молекулярных орбиталей изомера *ZEZ-NH* и *ZEE-NH* приведены на рис. 3.27. Несимметричная форма полосы поглощения в области 350–550 нм определяется перекрыванием спектров поглощения двух изомерных форм. Наибольший вклад соответствует переходам ВЗМО→НСМО изомеров *ZEE-NH* 437 нм и *ZEZ-NH* – 424 нм, которые относятся к типу π – π^* . Обе орбитали имеют схожий характер и аналогичны в соединениях **En(1–3, 7)**. Так же заметный вклад в форму экспериментальной полосы поглощения оказывает переход π – π^* типа в *ZEE-NH* и *ZEZ-NH* изомерах, соответствующий одноэлектронному возбуждению ВЗМО-1→НСМО. ВЗМО и НСМО делокализованы по изобензофурановым и циклогексадионовым фрагментам, связанным бутадиеновым линкером. ВЗМО-1 и НСМО+1 представляют собой π -орбитали, делокализованные по азометиным и циклогексадионовым фрагментам (рис. 3.27). Таким образом, в “открытом” изомере енаминокетонов присутствуют две слабо взаимодействующие π -сопряженные системы, определяющие их спектры в видимой области.

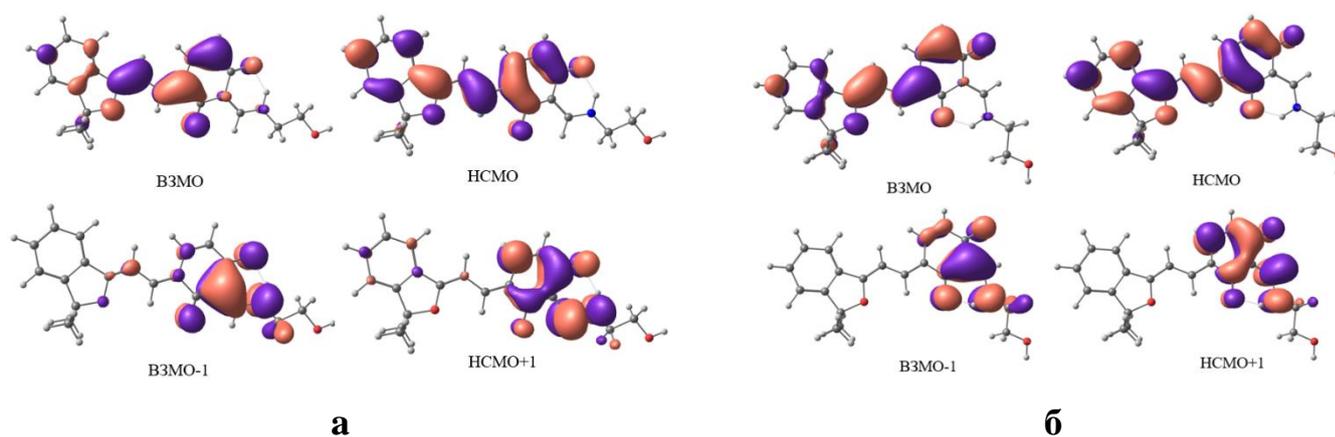


Рисунок 3.27. Граничные молекулярные орбитали изомера *ZEE*-NH (**а**) и *ZEZ*-NH (**б**) для енаминокетона **En1** в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

Для соединения **En7** наблюдалась дополнительная полоса поглощения в области 300–370 нм соответствует переходам ВЗМО-1→НСМО+1 (соответствует шестому возбужденному состоянию, формы МО изомера *ZEZ*-NH приведены на рисунке 3.28). Как и другие енаминокетоны, в изомере *ZEZ*-NH соединения **En7** ВЗМО и НСМО делокализованы по изобензофурановым и циклогексадионовым фрагментам, связанным бутадиеновым линкером. Однако ВЗМО-1 и НСМО+1, помимо расположения на азометиновых и циклогексадионовых остатках, расположены ещё и на фенильном фрагменте заместителя (рис. 3.28). Это может вызывать различие в спектре поглощения *ZEZ*-изомера соединения **En7** по сравнению с енаминокетонами, образованными из алифатических аминов.

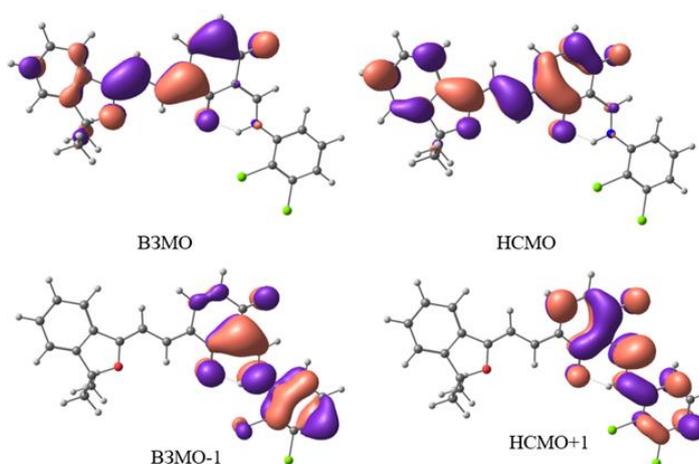


Рисунок 3.28. Граничные молекулярные орбитали изомера *ZEZ*-NH для енаминокетона **En7** в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

Для енаминокетонов рассчитанные наиболее длинноволновые полосы поглощения соединений **En(1–3, 7)** лежат в интервале 423–439 нм и характеризуются значительно более высокими значениями силы осциллятора, чем изомерная форма Sp-OH, что довольно близко к наблюдаемым экспериментальным спектрам соединений (рис. 3.26).

3.2.3 Рентгеноструктурный анализ (РСА)

Монокристаллические образцы **En1** ($R=(CH_2)_2OH$) и **En5** ($R=3,4$ -диметилфенил) были получены медленным упариванием метанольного раствора и использовались для исследования методом рентгеноструктурного анализа. Соединение **En1** кристаллизуется в триклинной пространственной группе с четырьмя симметрично независимыми молекулами в элементарной ячейке с близкой молекулярной геометрией [169]. Молекулярная структура показана на рис. 3.29, и избранные геометрические параметры приведены в таблицах S8 и S9 Приложения.

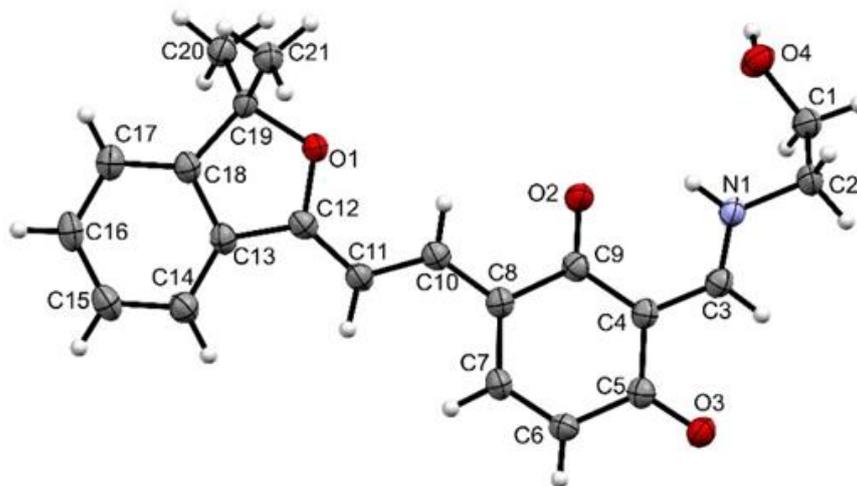


Рисунок 3.29. Строение молекулы соединения **En1** ($R=(CH_2)_2OH$) по данным РСА.

Молекула **En1** в кристаллическом состоянии представляет собой енаминокетонный изомер и образует конформацию *ZEZ*-NH, которая совпадает с основным компонентом раствора соединения **En1** в ДМСО по данным спектроскопии ЯМР. Данным ИК-спектроскопии структура молекулы

не является строго плоской, несмотря на сильное π -сопряжение между изобензофурановым и циклогексадионовым фрагментами.

Пятичленный цикл $O^1-C^{12}-C^{13}-C^{18}-N^1$ близок к планарному строению, что делает метильные группы магнитно эквивалентными. Наблюдается прочная внутримолекулярная водородная связь $N^1-H \cdots O^2$ со следующими структурными характеристиками: $d(O^1 \cdots N^1) = 2.641(3) \text{ \AA}$, $d(N^1-H) = 0.86 \text{ \AA}$, $d(O^2 \cdots H) = 1.98 \text{ \AA}$ и $\omega(O^2 \cdots H-N^1) = 133^\circ$.

Енаминокетонная изомерная форма наблюдается и в случае кристаллов соединения **En5**, однако кристаллическое строение этого соединения оказалось необычным [170]. Молекулярная структура показана на рис. 3.30.

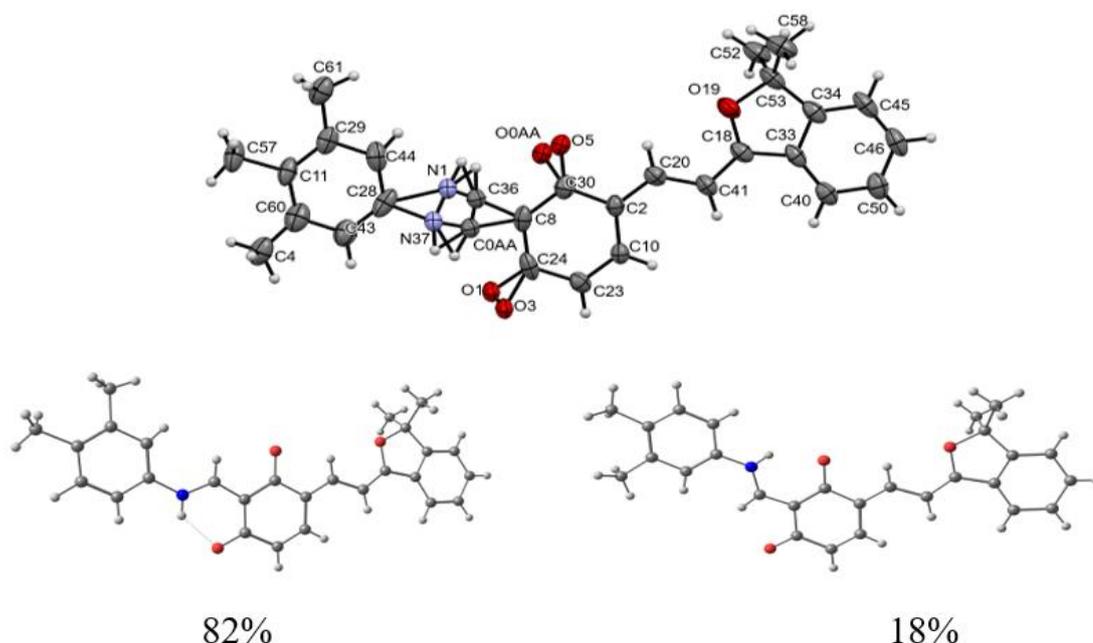


Рисунок 3.30. Вверху: строение молекулы соединения **En5** ($R=3,4$ -диметилфенил) по данным РСА; внизу: строение молекул с заселенностями 82% и 18%.

По полученным данным, в кристалле наблюдается структурная разупорядоченность с соотношением заселенностей 82:18, связанная с сосуществованием в кристаллической решетке двух конформеров енаминкетонной формы – *ZEE*-NH (заселенность 82%) и *ZEZ*-NH (заселенность 18%). Необычным является как характер разупорядоченности, определяемый

сосуществованием двух различных конформеров в кристаллической решетке, так и большая стабилизация конформера типа *ZEE-NH* относительно *ZEZ-NH*.

3.3 Исследование комплексообразования в растворе

Тиосемикарбазоны

Фрагмент “N–NH–C=S” в производных тиосемикарбазонов может действовать как активный центр, образуя хелаты с ионами некоторых металлов. Как показано, тиосемикарбазоны в растворе ацетонитрила находятся в циклической или “закрытой” форме, образуя бесцветный раствор. Для исследования комплексообразования в растворе ацетонитрила брали растворы тиосемикарбазонов с концентрацией $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М и добавляли десятикратный избыток соответствующий соли металла (использовались перхлораты меди, кобальта и никеля). Спектральные свойства комплексов тиосемикарбазонов приведены в таблице S10 Приложения.

Действительно, растворы тиосемикарбазонов в ацетонитриле имеют интенсивные полосы поглощения в области 250–370 нм. Добавление солей Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} приводит к темному окрашиванию растворов координационных соединений из-за появления новых полос поглощения в видимой области (400–650 нм). На рисунках 3.31 и 3.32 приведены спектры соединений **Tn4** и **Tn6**, которые будет рассмотрены подробно.

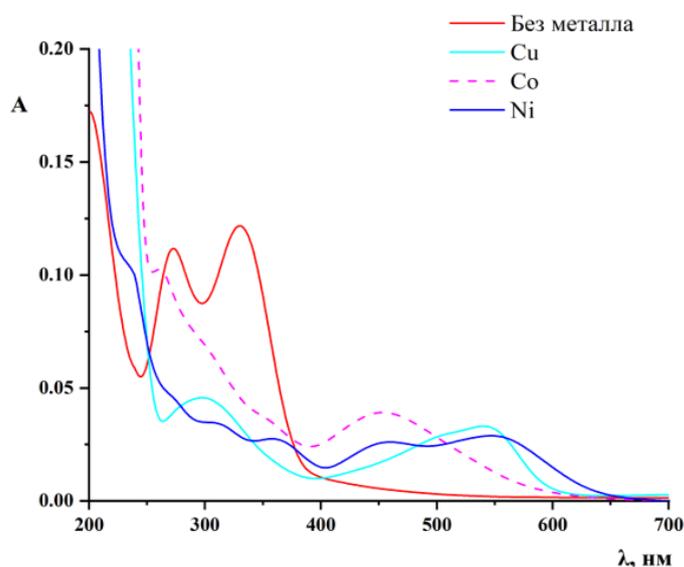


Рисунок 3.31. Спектры поглощения тиосемикарбазона **Tn4** (R=Ph), $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М без и после добавления солей Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в ацетонитриле, $C = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $T = 293$ К.

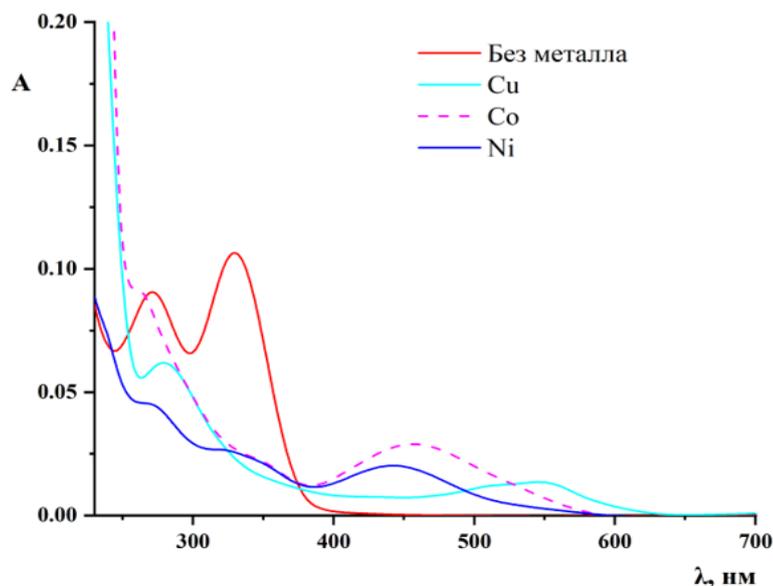


Рисунок 3.32. Спектры поглощения тиосемикабазона **Tn6** (R=2,4-диметилфенил) $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М без и после добавления солей Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в ацетонитриле, $C = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $T = 293$ К.

Область максимального поглощения растворов тиосемикабазонов, содержащих ионы металлов, смещена в область с большей длиной волны, чем область поглощения исходных тиосемикарбазонов. В случае тиосемикарбазона **Tn4** при добавлении перхлората меди максимального поглощения наблюдается при 549 нм, при добавлении иона Ni^{2+} $\lambda_{max} = 556$ нм, наименьший сдвиг наблюдается в случае иона Co^{2+} $\lambda_{max} = 456$ нм. В случае тиосемикарбазона **Tn6** при добавлении перхлората меди наиболее длинноволновое поглощение наблюдается при 549 нм, при добавлении иона Ni^{2+} $\lambda_{max} = 550$ нм, наименьший батохромный сдвиг наблюдается в случае иона Co^{2+} $\lambda_{max} = 456$ нм.

С помощью методов квантовохимического моделирования были проведены расчеты пространственного строения комплексного соединения Cu^{2+} с “закрытой” (SP) и двумя возможными “открытыми” (ZEZ и EZE) формами тиосемикарбазона **Tn4** в газовой фазе. Оптимальные структуры и их относительные энергии приведены на рисунке 3.33.

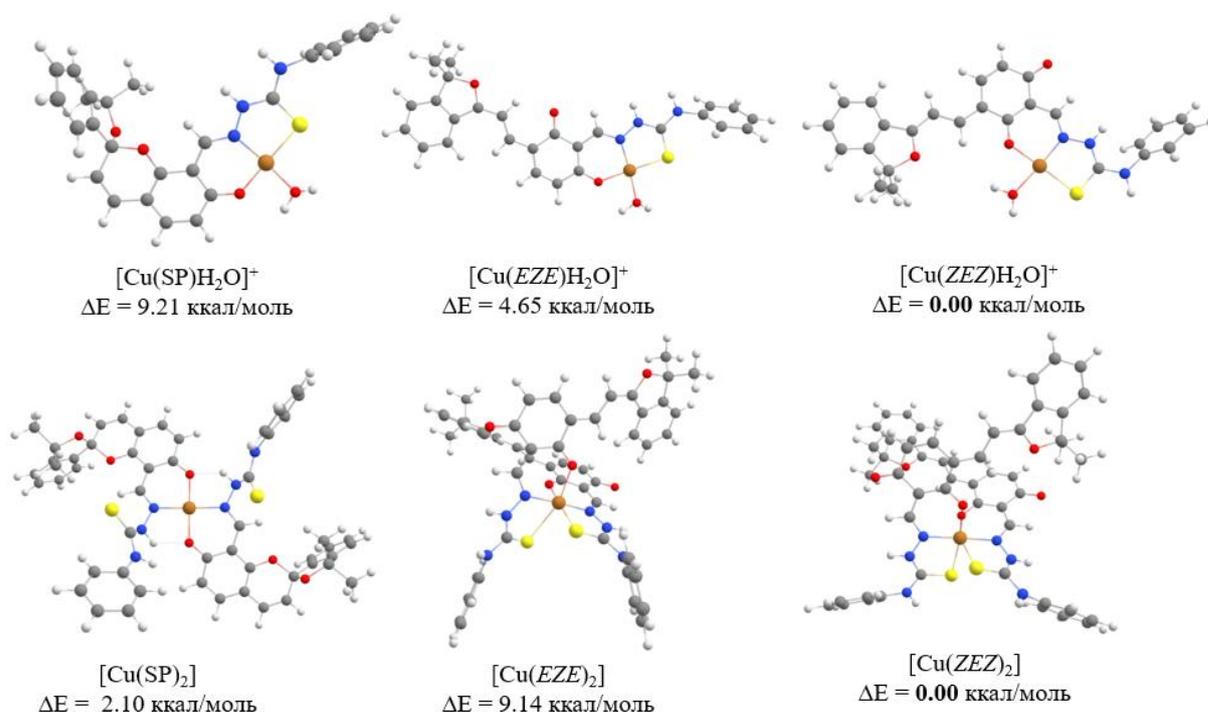


Рисунок 3.33. Оптимизированные модели DFT возможных сценариев комплексообразования между лигандом тиосемикабазона **Tn4** (R=Ph) и катионом Cu^{2+} в растворе ДМСО (B3LYP/6-311G(d)).

Были рассмотрены две модели комплексообразования в соотношении L : M (лиганд : металл) = 1:1 и в соотношении 2:1. В первом случае, координационная сфера Cu^{2+} насыщалась до координационного числа 4 координированной молекулой воды - $[\text{CuL}(\text{H}_2\text{O})]^+$. Во втором случае, координация двух лигандов осуществлялась через донорные атомы азота, серы и кислорода. Теоретические расчеты показали, что в первом случае образование комплексного соединения Cu^{2+} с “открытой” формой тиосемикарбазона энергетически более выгодно, чем с “закрытым” изомером лиганда в комплексе $[\text{Cu}(\text{SP})\text{H}_2\text{O}]^+$. При этом комплекс $[\text{Cu}(\text{ZEZ})\text{H}_2\text{O}]^+$ оказывается более стабильным, чем комплекс $[\text{Cu}(\text{EZE})\text{H}_2\text{O}]^+$. Во втором случае, тиосемикарбазон реагирует с ионами Cu^{2+} в соотношении 2:1 с образованием комплексов: $[\text{Cu}(\text{SP})_2]$, $[\text{Cu}(\text{ZEZ})_2]$, и $[\text{Cu}(\text{EZE})_2]$. При этом комплекс с лигандом, существующим в “открытой” ZEZ форме, также имеет более устойчивую структуру. В комплексах $[\text{Cu}(\text{ZEZ})_2]$ и $[\text{Cu}(\text{EZE})_2]$ два тиосемикабазоновых лиганда окружают катион меди(II), образуя первую координационную сферу,

содержащую два атома кислорода, два атома серы и два атома азота, координационное число (КЧ) катиона меди равно шести. В комплексе $[\text{Cu}(\text{SP})_2]$ в координации лигандов атомы серы не участвуют и КЧ иона меди равно четырем. Дестабилизация комплекса с SP-изомером составляет 9.21 ккал/моль для комплекса состава 1:1 и 2.10 ккал/моль для бис-хелатного комплекса.

Проведенные методом TD-DFT (B3LYP/6-311G(d)) расчеты спектров поглощения изомеров $[\text{Cu}(\text{SP})\text{H}_2\text{O}]^+$ и $[\text{Cu}(\text{ZEZ})\text{H}_2\text{O}]^+$ комплекса тиосемикарбазона **Tn4** с Cu^{2+} приведены на рис. 3.34.

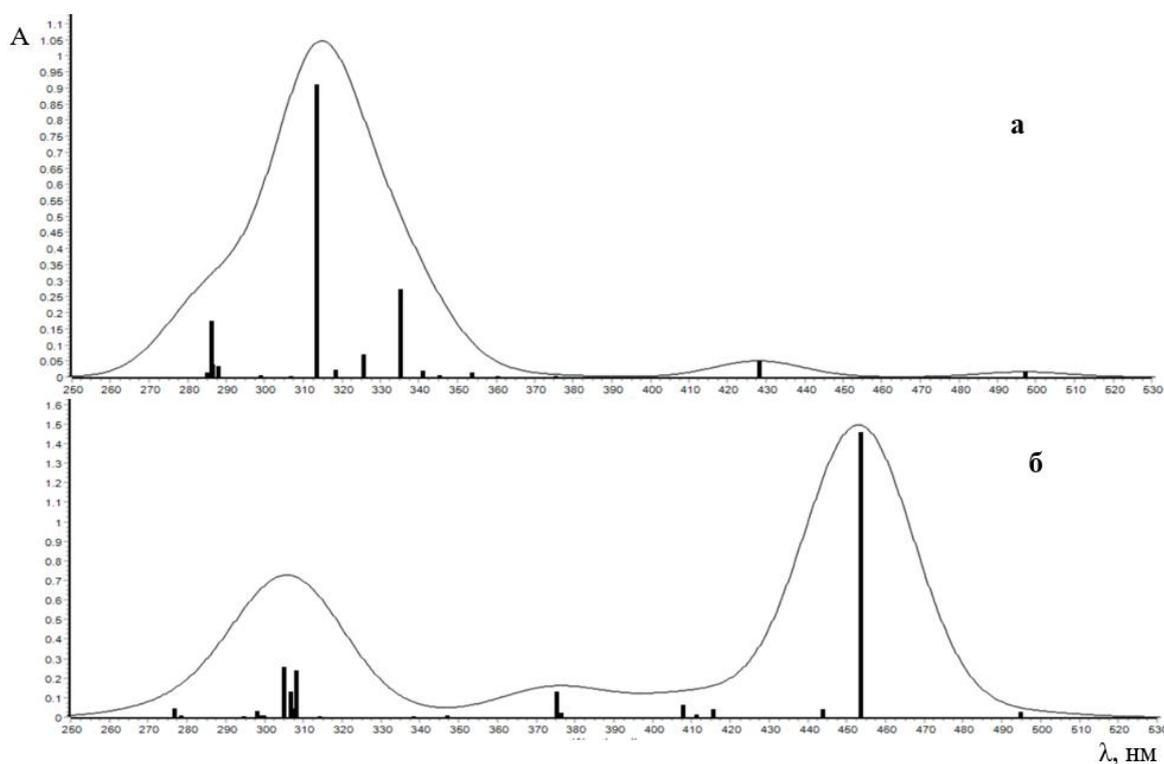


Рисунок 3.34. Рассчитанные методом TD-DFT (B3LYP/6-311G(d)) спектры поглощения изомеров $[\text{Cu}(\text{SP})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**a**) и $[\text{Cu}(\text{ZEZ})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**б**) комплекса тиосемикарбазона **Tn4** (R=Ph).

Видно, что в случае комплексообразования ионов меди с спироциклической формой лиганда, максимальное поглощение соответствует области 260–360 нм, в то время как для изомерного комплекса $[\text{Cu}(\text{ZEZ})\text{H}_2\text{O}]^+$ максимальное поглощение должно смещаться в область 420–550 нм. Именно такое смещение наблюдается в растворах **Tn4** и соли Cu^{2+} , что позволяет

утверждать, что в растворе образуется комплекс меди с “открытым” изомером лиганда.

Формирование комплекса может происходить по двум механизмам. Первый механизм (рис. 3.35): Тиосемикабазоны, присутствующие в растворе в “закрытой” изомерной форме SP, соединяются с ионами Cu^{2+} в соотношении 1:1 или 1:2, образуя комплексы $[\text{Cu}(\text{SP})\text{H}_2\text{O}]^+$ (соединения **1** на схеме 3.35) и $[\text{Cu}(\text{SP})_2]$ (соединения **2** на схеме 3.35), соответственно. Вторая стадия включает реакцию раскрытия пиранового цикла комплексов с образованием стабильного комплекса **3** или **4**, соответственно.

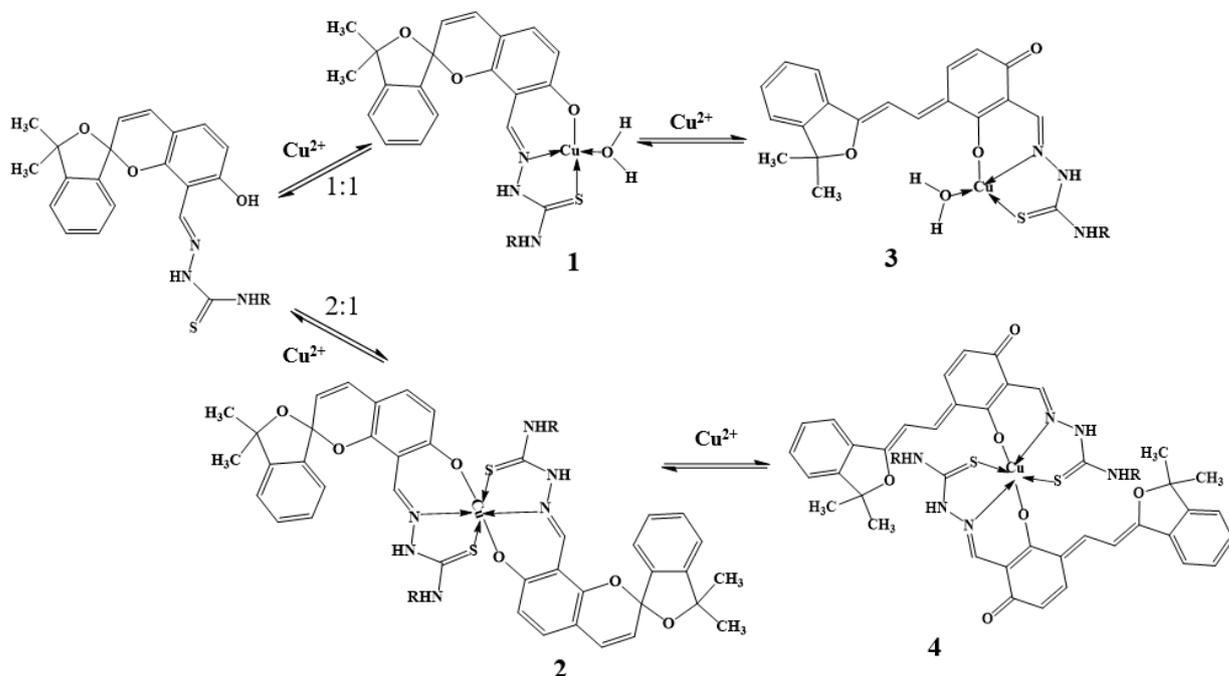


Рисунок 3.35. Схема комплексообразования тиосемикабазонов и ионов Cu^{2+} по первому механизму.

Второй механизм (рис. 3.36): Первая стадия протекает с образованием мероцианиновой формы в растворе за счет термической активации. Вторая стадия включает реакцию катиона Cu^{2+} (или иона другого металла) в соотношении 1:1 или 1:2 с “открытой” формой тиосемикарбазона с образованием стабильного комплекса.

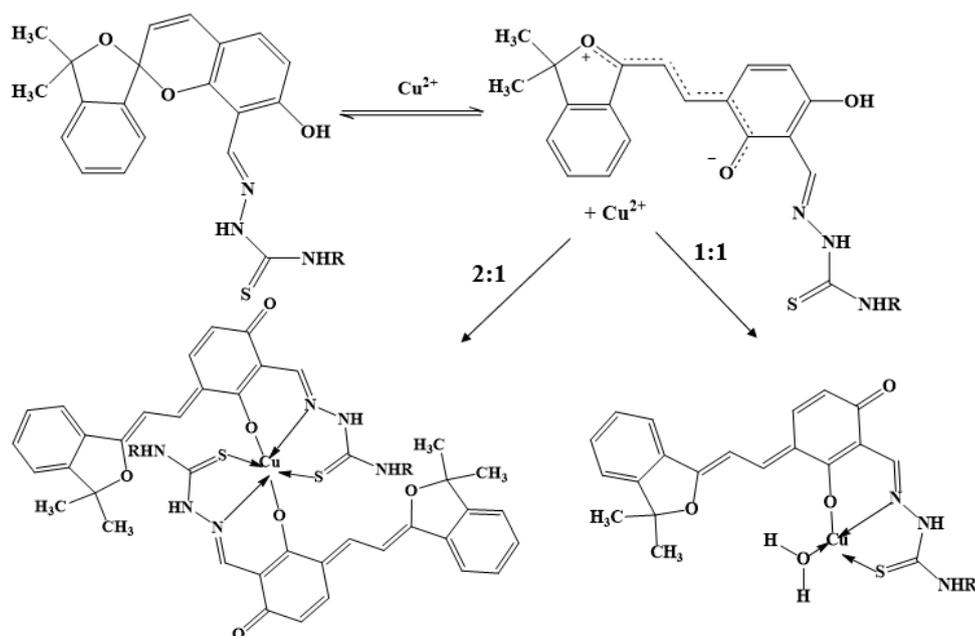


Рисунок 3.36. Схема комплексообразования тиосемикабазонов и ионов Cu^{2+} по первому механизму.

Сделать однозначный вывод о механизме данной реакции не представляется возможным.

Енаминокетоны

Исходный раствор енаминокетонов в ацетонитриле имеет красный цвет. Добавление солей меди вызывает углубленную окраску. Новые полосы поглощения находятся в видимой области спектра 500–650 нм за счет образования комплекса с ионами Cu^{2+} с максимумом поглощения при 538 (**En1**), 565 (**En2**) и 596 нм (**En4**)... (рисунок 3.37 и таблица S10 Приложения). Однако при добавлении к раствору енаминокетонов в ацетонитриле солей ионов металлов Co^{2+} и Ni^{2+} не наблюдалось появление новых полос поглощения, что свидетельствовало об отсутствии комплексообразования между енаминокетонами и ионами Co^{2+} и Ni^{2+} , либо о малой величине константы устойчивости комплексов.

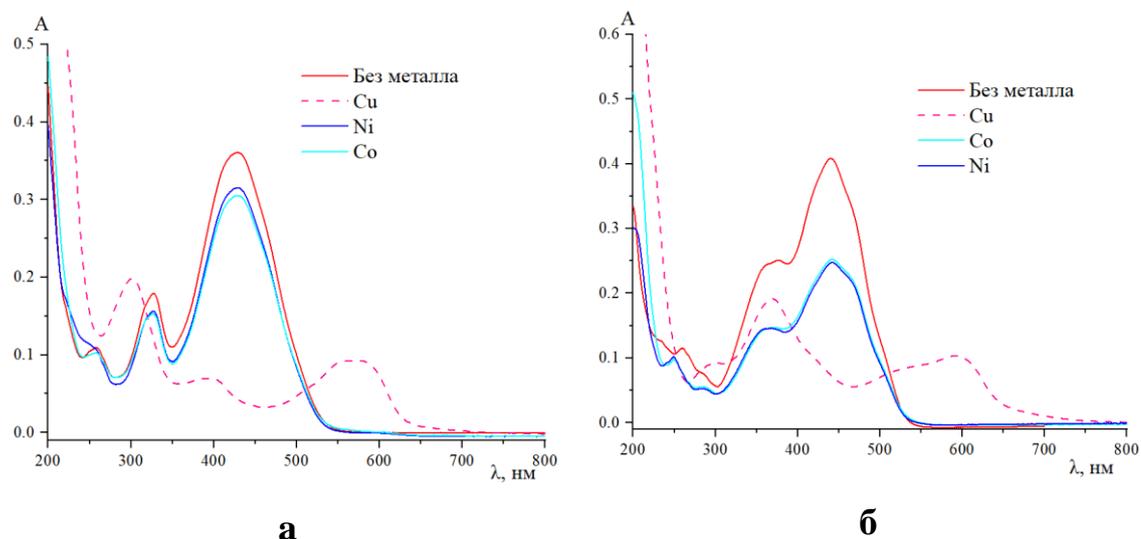


Рисунок 3.37. Спектры поглощения енаминокетона **En3** ($R=C(CH_3)_3$) (**а**) и **En4** ($R=n$ -толил) (**б**) $C = 1.0 \times 10^{-5}$ М без и после добавления ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} в ацетонитриле, $C = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $T = 293$ К.

С помощью методов квантово-химического моделирования определили способность к образованию комплексов между енаминокетонами **En3** и ионами Cu^{2+} в газовой фазе. Были также рассмотрены две модели комплексообразования (рис. 3.38).

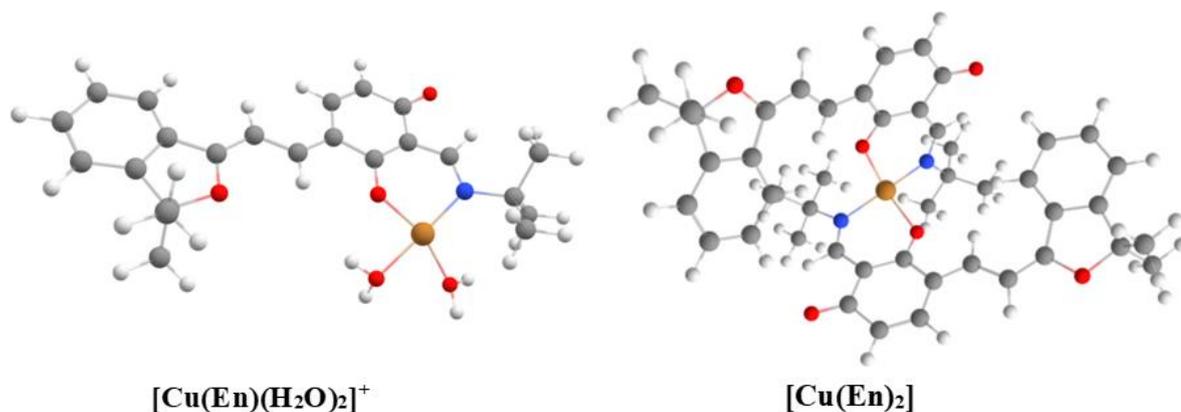


Рисунок 3.38. Оптимизированные модели DFT двух возможных сценариев комплексообразования между енаминокетонами **En3** ($R=C(CH_3)_3$) и ионами Cu^{2+} (B3LYP/6-311G(d)).

В первом случае, рассмотрим комплекс состава $[Cu(En)(H_2O)_2]^+$: енаминокетон реагирует с ионами Cu^{2+} в соотношении 1:1. Координационная сфера иона меди достраивалась координацией двух молекул воды. Во втором

случае рассматривался комплекс состава $[\text{Cu}(\text{En})_2]$. Согласно такой модели, две молекулы лиганда окружают катион Cu^{2+} , образуя первую координационную сферу, содержащую два атома кислорода и два атома азота, характеризующуюся *транс*-плоскоквадратной формой.

Предполагаемая структура комплексов, возникшая в следствии добавления ионов металлов к раствору енаминокетонов, указана на рисунке 3.39.

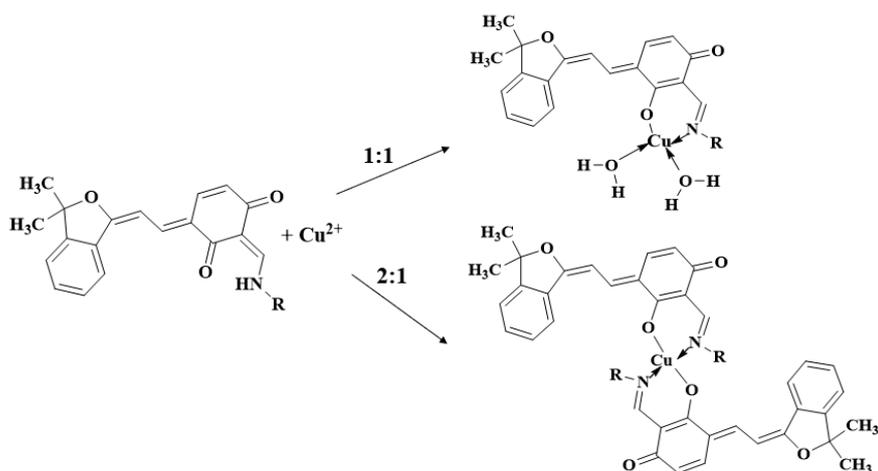


Рисунок 3.39. Схема комплексообразования енаминокетонов и ионов Cu^{2+} .

Таким образом, тиосемикарбазоны хорошо взаимодействуют с ионами металлов Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} . Взаимодействие с ионами металлов протекает по гидразонному фрагменту и сопровождается раскрытием пиранового кольца с образованием “открытой” МС формы, сдвигая спектр поглощения тиосемикарбазонов в область видимого света. Среди исследованных ионов металлов енаминокетоны взаимодействуют только с ионами Cu^{2+} .

3.4 Фотохромные свойства соединений

Для анализа фотохимических свойств, были изучены тиосемикарбазоны **Tn1**, **Tn8** и енаминокетоны **En(1, 2; 4–7)** в растворе ацетонитрила. Фотохимическая активность была зарегистрирована для тиосемикарбазонов **Tn1**, **Tn8** и енаминокетонов **En1**, **En2**.

Тиосемикарбазоны Tn1 и Tn8

Спектрально-кинетические свойства тиосемикарбазонов **Tn1** и **Tn8** представлены в табл. 4.

Таблица 4. Спектрально-кинетические свойства тиосемикарбазонов в ацетонитриле при 293 К.

Соед.	R	λ_{max}^{SP} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{max}^{MC} , нм	τ_{MC} , с
Tn1	CH(CH ₃) ₂	268(18.1); 328 (25.4)	450	70.7
Tn8	CH ₂ Ph	272(23.1); 330 (20.4)	486	15.6

Спектры поглощения соединения **Tn8** имеют полосы поглощения в области 250–370 нм. После облучения светом при $\lambda = 365$ нм наблюдается значительное смещение полос в спектре поглощения (проявляющееся в диапазоне 400–600 нм), с изменением окраски раствора с бесцветного на красный (рис. 3.40). Это объясняется образованием мероцианиновой формы MC, связанной с разрывом связи C_{spiro}–O. Исходные два ортогональных фрагмента становятся компланарными, и вся молекула образует большую π -сопряженную систему. Тиосемикарбазон **Tn8** характеризуется положительным (прямым) фотохромизмом.

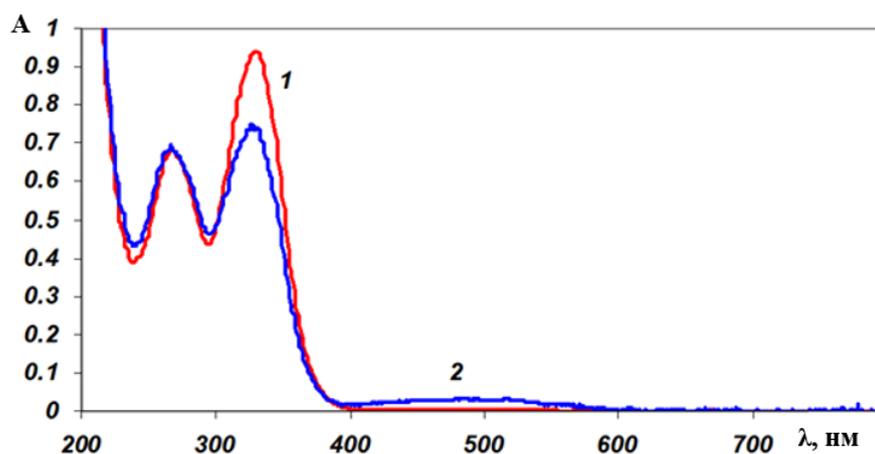


Рисунок 3.40. Спектры поглощения раствора тиосемикарбазона **Tn8** (R=CH₂Ph) в ацетонитриле до (1), после (2) последовательного облучения на длине волны 365 нм.

Динамика изменения спектра поглощения тиосемикарбазона **Tn8** (рис. 3.41) в ацетонитриле показывает, что тиосемикарбазон **Tn8** является обратимой фотохромной системой, характеризуется значением времени жизни фотоиндуцированного изомера, составляющим 15.6 с (в табл. 4).

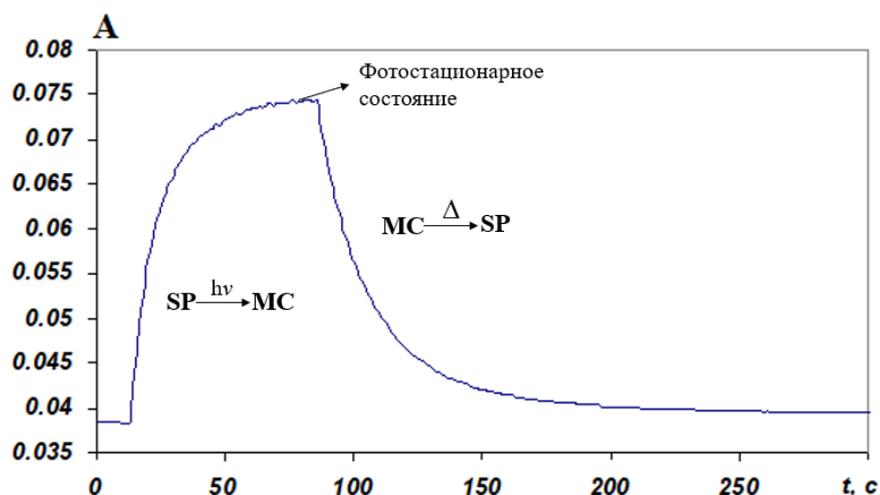


Рисунок 3.41. Кинетическая кривая фотоокрашивания и темновой релаксации фотоиндуцированной формы раствора тиосемикарбазона **Tn8** ($R=CH_2Ph$) в ацетонитриле на длине волны 485 нм.

Как упоминалось выше, для тиосемикарбазона **Tn1** после облучения светом с длиной волны 365 нм наблюдалось снижение интенсивности поглощения “закрытого” изомера в области 300–400 нм и появление новой полосы поглощения низкой интенсивности в области 400–500 нм (рис. 3.42). Соединения **Tn1** характеризуется значением времени жизни фотоиндуцированного изомера, составляющим 70.7 с.

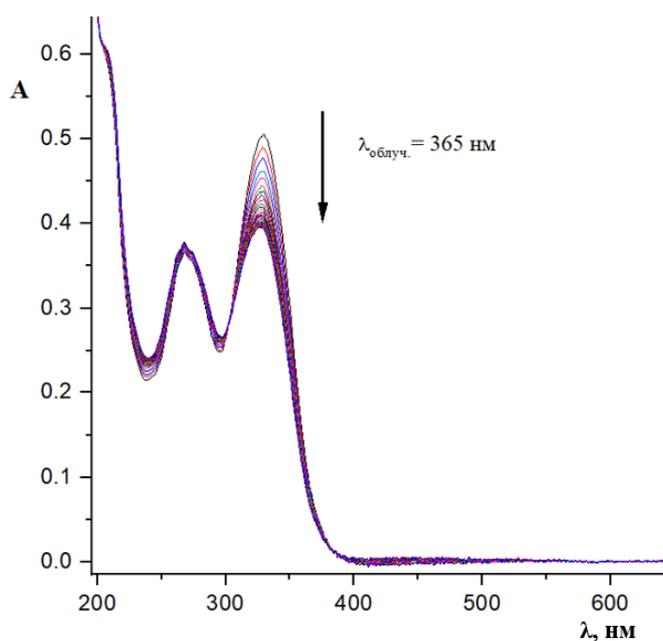


Рисунок 3.42. Спектры поглощения тиосемикарбазона **Tn1** ($R=CH(CH_3)_2$) в ацетонитриле при облучении светом на длине волны 365 нм.

Изомер SP тиосемикарбазонов (бесцветный раствор) при облучении на длине волны 365 нм переходил в форму MC (окрашенный раствор). Когда облучение прекращали, изомер MC возвращался в SP (бесцветный) изомер в результате так называемой темновой термической релаксации. Происходящий процесс изображен на рисунке 3.43.

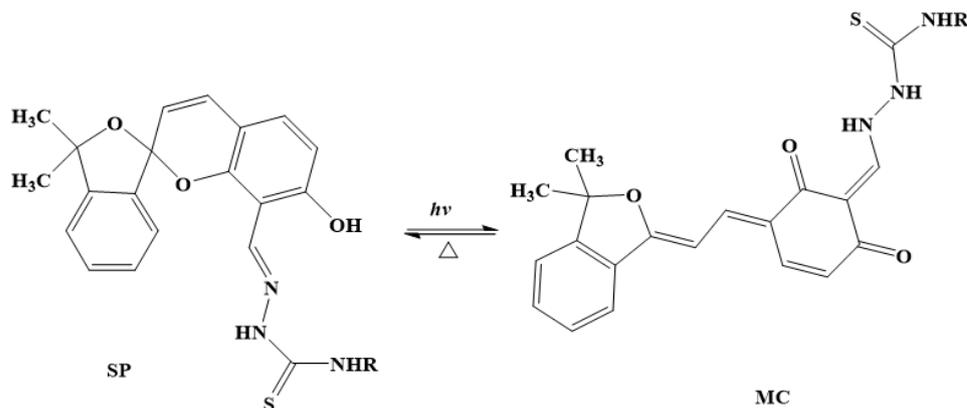


Рисунок 3.43. Фотохимическое превращение и темновая релаксация тиосемикарбазонов **Tn1** (R=CH(CH₃)₂) и **Tn8** (R= CH₂Ph).

Енаминокетоны **En**(1, 2, 4–7)

Изучение поведения енаминокетонов **En**(1, 2, 4–7) в растворе ацетонитрила при облучении показало, что фотохимическая активность характерна для енаминокетонов **En1**, **En2**. Экспериментальные спектрально-кинетические свойства енаминокетонов представлены в табл. 5.

Таблица 5. Спектрально-кинетические свойства енаминокетонов в ацетонитриле при 293 К.

Соед.	R	λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ_1 , с	τ_2 , с
En1	(CH ₂) ₂ OH	261(17.1); 328(20.9); 429(49.8)	17.2	301.5
En2	CH(CH ₃) ₂	259(7.4); 326(13.9); 429(31.1)	22.3	222.1
En4	<i>n</i> -толил	434(39)	-	-
En5	3,4-диметилфенил	437(45.1)	-	-
En6	4-нитрофенил	444(40.5)	-	-
En7	2,3-дихлорфенил	249(10.6); 443(30.5)	-	-

Енаминокетоны **En1**, **En2** обладают отрицательным фотохромизмом. Облучение раствора енаминокетонов **En1**, **En2** видимым светом при $\lambda = 436$ нм

сопровождается уменьшением интенсивности полосы поглощения в области длинных волн. После прекращения облучения наблюдается восстановление интенсивности этой полосы (см. рис. 3.44). Это свидетельствует об фотохимическом образовании “закрытой” (SP) изомерной формы и последующем образовании “открытой” (MC) формы в процессе темновой релаксации. Это свидетельствует об обратимости изомеризации между изоформами MC и SP в случае енаминокетонов **En1** и **En2**.

Двухэкспонентная кинетика процесса темновой релаксации может объясняться протеканием двух элементарных химических реакций – 1,5-сигматропного переноса протона (более быстрая стадия) и последующего процесса образования пиранового цикла (более медленная стадия). Скорость быстрого процесса определяется временем 17.2–22.3 с, характеристическое время второго процесса – значительно больше, 222.1–301.5 с (в табл. 5). Спектр поглощения енаминокетона **En1** при облучении светом с $\lambda = 436$ нм и после прекращения облучения и динамика изменений оптической плотности в максимуме поглощения в ходе облучения представлены в рисунках 3.44 и 3.45.

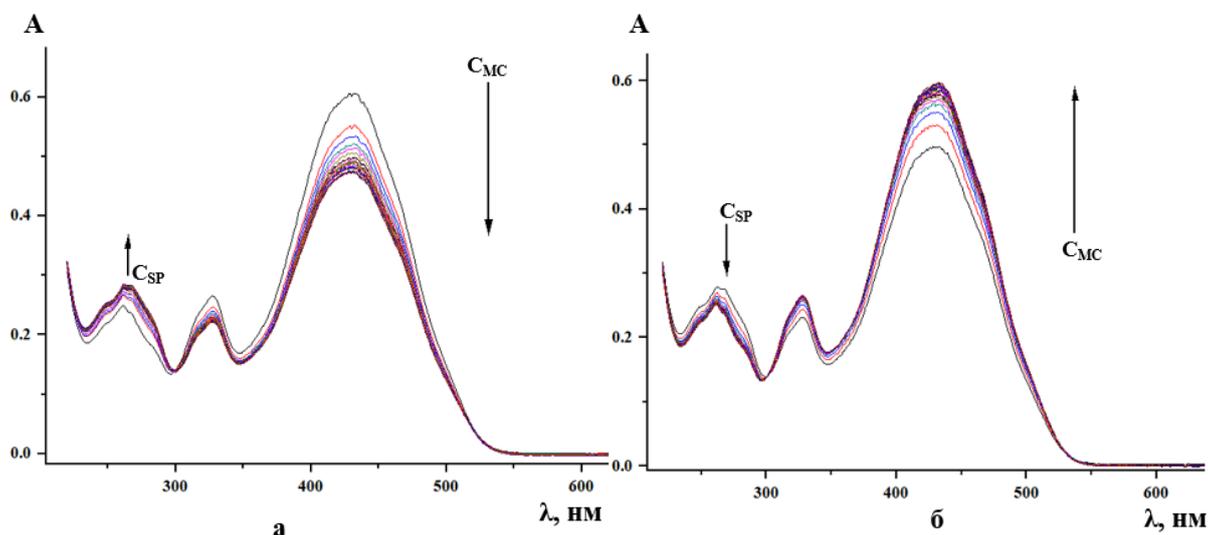


Рисунок 3.44. Спектры поглощения енаминокетона **En1** ($R=(CH_2)_2OH$) в ацетонитриле при облучении светом с $\lambda = 436$ нм (**а**) и после прекращения облучения (**б**).

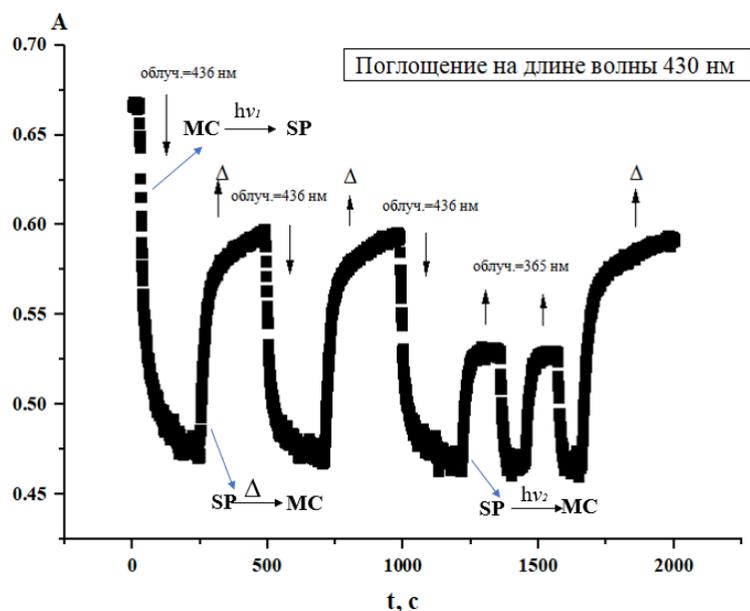


Рисунок 3.45. Динамика изменений оптической плотности в максимуме поглощения енаминокетона **En1** ($R=(\text{CH}_2)_2\text{OH}$) в ацетонитриле в ходе облучения (436, 365 нм).

Обратная реакция раскрытия спироцикла может протекать как под действием облучения на длине волны 365 нм, так и за счет термической тепловой релаксации. Происходящий процесс изображен на рисунке 3.46.

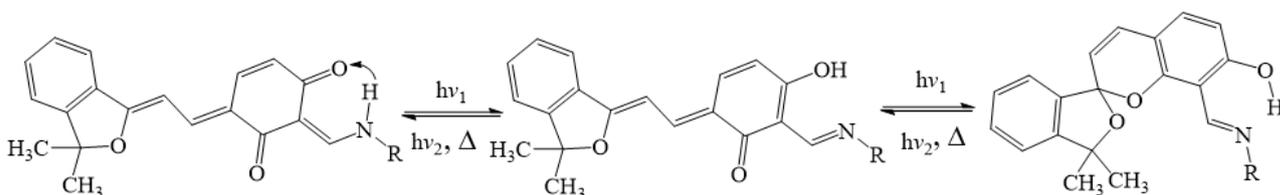


Рисунок 3.46. Фотохимическое превращение енаминокетонов **En1** ($R=(\text{CH}_2)_2\text{OH}$) и **En2** ($R=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

Спектр поглощения енаминокетона **En5** характеризуется длинноволновым с максимумом при 437 нм (рис. 3.47). Облучение раствора соединения **En5** источником видимого света с длиной волны 436 нм значительно снижало интенсивность длинноволнового поглощения, однако это не приводило к образованию новых спектральных полос. После прекращения облучения интенсивность полос поглощения не восстанавливалась.

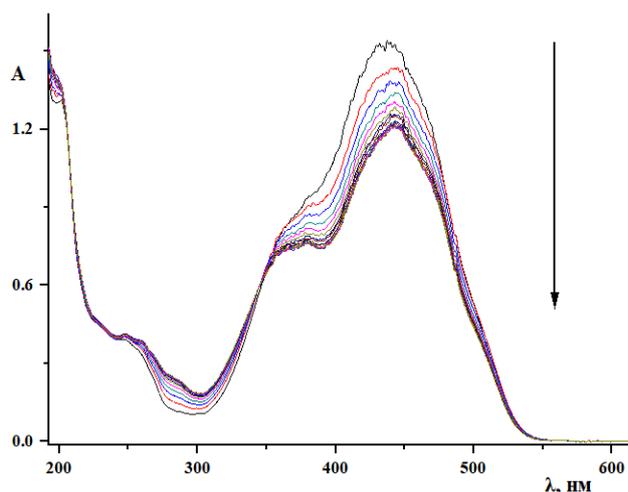


Рисунок 3.47. Спектры поглощения енаминокетона **En5** (R=3,4-диметилфенил) в ацетонитриле.

Последующее облучение источником света с длиной волны 365 нм показало увеличение оптической плотности, но так же имело необратимый характер (рис. 3.48). Кинетические данные свидетельствуют об отсутствии инверсии между MC-SP-изомерами енаминокетона **En5** и о том, что облучение не приводит к образованию продуктов, связанных с замыканием пиранового цикла. Следовательно, можно предположить, что такое поведение **En5** представляет собой необратимую *E*-, *Z*-изомеризацию “открытой” формы енаминкетона.

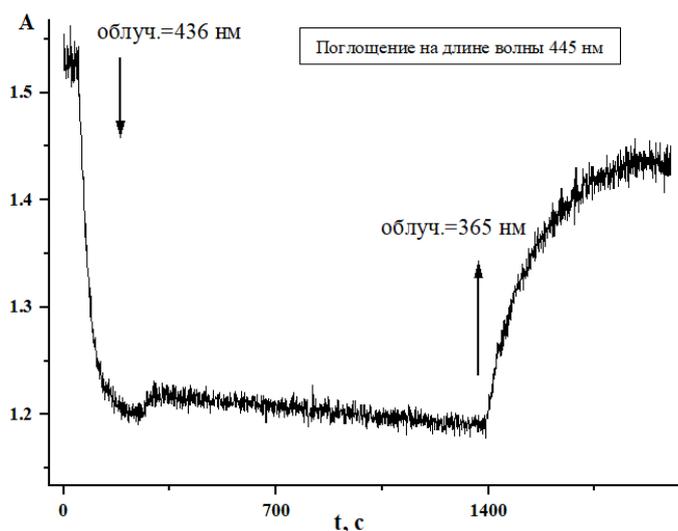


Рисунок 3.48. Динамика изменений оптической плотности в максимуме поглощения енаминокетона **En5** (R=3,4-диметилфенил) в ацетонитриле в ходе облучения (436, 365 нм).

Для других рассмотренных соединений **En(4, 6, 7)** изменения спектральных свойств при облучении не наблюдалось.

Таким образом, тиосемикарбазоны проявляют прямой фотохромизм, а для енаминокетонов характерен отрицательный фотохромизм.

3.5 Использование тиосемикарбазона **Tn8** для аналитического обнаружения аминокислот

Соединение **Tn8** оказалось перспективным аналитическим реагентом для количественного определения концентрации L-глутатиона. Были изучены [171] электронные спектры поглощения растворов тиосемикарбазона **Tn8** в ацетонитриле с концентрацией 5.0×10^{-5} М в присутствии различных низкомолекулярных аминотиолов – L-глутатиона (GSH), L-цистеина (Cys), L-гомоцистеина (Hcy), L-глицина (Gly), и L-метионина (Met) при pH = 7.4 (использовали трис-HCl буферный раствор). Полученные спектры приведены на рисунке 3.49.

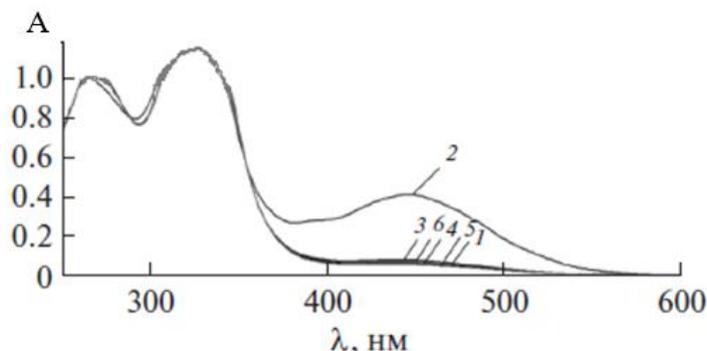
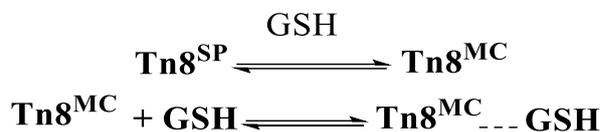


Рисунок 3.49. Электронные спектры поглощения раствора тиосемикарбазона **Tn8** в ацетонитриле (5.0×10^{-5} М) в отсутствие (1) и в присутствии 1.0×10^{-3} М аминотиолов GSH (2), Cys (3), Hcy (4), Gly (5) и Met (6) [171].

Как видно, в присутствии L-глутатиона (GSH) наблюдается значительное увеличение оптической плотности раствора в длинноволновой области спектра 360–550 нм. При этом, присутствие остальных аминотиолов в растворе не приводит к спектральным изменениям соединения в этой области.

Увеличение поглощения в области 360–550 нм определяется формированием молекулярного комплекса глутатиона с мероцианиновой

изомерной формой тиосемикарбазона **Tn8**. В присутствии аминотиолов Cys, Hcy, Gly и Met тиосемикарбазон **Tn8** остается в закрытой спироциклической изомерной форме. Процесс реакции тиосемикарбазона **Tn8** с GSH изображен на схеме:



Для оценки чувствительности реакции и предела обнаружения GSH в присутствии **Tn8** (1.0×10^{-4} М) определяли путем измерения оптической плотности ацетонитрильных растворов при различной концентрации GSH (в интервале $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-4}$ М) в буфере с pH = 7.4. Увеличение оптической плотности при длине волны 450 нм происходит пропорционально увеличению концентрации L-глутатиона. Это позволяет оценить константу связывания в комплекс **Tn8**^{MC}...**GSH**. Для расчета константы связывания использовали уравнение (2.1), рассчитанная величина константы устойчивости – 1.05×10^6 М⁻¹. Константа устойчивости весьма велика, что позволяет использовать **Tn8** как аналитический реагент при спектрофотометрическом определении L-глутатиона, даже в присутствии ряда других аминотиолов.

Получена градуировочная зависимость вида:

$$\frac{A - A_0}{A_0} = c_{\text{GSH}} K + b \quad (3.1)$$

Где A_0 и A – значения оптической плотности при 450 нм в отсутствие и в присутствии GSH, соответственно.

Параметры градуировочной функции представлены в табл. 6.

Таблица 6. Параметры градуировочной функции для спектрофотометрического определения L-глутатиона.

Коэффициенты градуировочной зависимости			$c_{\text{мин}}, \text{M}$
K	b	r	
3.9×10^4	1.2	0.956	1.2×10^{-7}

r: коэффициент корреляции, $c_{\text{мин}}$: предел обнаружения.

Следует отметить, что скорость изомеризация тиосемикарбазона **Tn8** из спиро- в мероцианиновую форму зависит от содержания в растворе GSH. На рисунке 3.50 показана динамика спектральных изменений растворов **Tn8** в ацетонитриле.

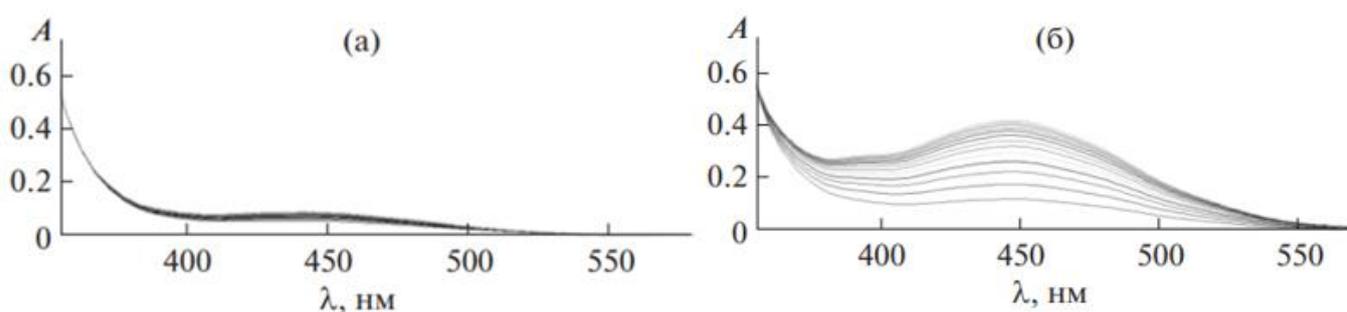


Рисунок 3.50. Динамика спектральных изменений растворов тиосемикарбазона **Tn8** в ацетонитриле (1.0×10^{-4} M) в отсутствие (а) и в присутствии GSH (4.0×10^{-5} M) (б); pH = 7.4, спектры зарегистрированы с интервалом 2 мин. [171].

В отсутствие GSH спектральные изменения в растворе не наблюдаются (рис. 3.50а). При его наличии в растворе наблюдается последовательное увеличение поглощения с максимумом в области 450 нм (рис. 3.50б). Кинетика процесса изомеризации соответствует реакции первого порядка.

3.6 Тестирование на биологическую активность

3.6.1 Изучение *in vitro* противораковой активности

Тринадцать из семнадцати синтезированных соединений (7 тиосемикарбазонов и 6 енаминокетонов) были изучены на цитотоксическую активность *in vitro* в отношении четырех типичных раковых клеточных линий человека: гепатоцеллюлярной карциномы (Hep-G2), карциномы молочной

железы (MCF-7), рака легких (A549), и плоскоклеточной карциномы полости рта (KB) [168-170]. Результаты представлены в таблице 7. В качестве эталона сравнения использовали эллиптицин.

Таблица 7. Антипролиферативная активность тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En** (IC₅₀: Концентрация полумаксимального ингибирования, μM).

Соед.	R	IC ₅₀ (μM)			
		Нер-G2	MCF-7	KB	A549
Tn1	CH(CH ₃) ₂	14.00±0.10	16.00±0.53	2.43±0.06	3.69±0.09
Tn2	C(CH ₃) ₃	96.00±3.12	10.57±0.34	1.43±0.04	3.45±0.09
Tn3	H	40.62±4.01	28.47±1.75	20.00±1.30	-
Tn5	<i>n</i> -толил	15.33±0.21	20.17±0.82	1.92±0.07	1.84±0.06
Tn6	2,4-диметилфенил	44.97±1.24	18.96±0.78	1.77±0.06	3.04±0.08
Tn8	CH ₂ Ph	21.50±1.18	8.00±0.12	3.45±0.08	4.36±0.09
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	17.23±0.65	14.86±0.32	3.44±0.07	4.27±0.08
En1	(CH ₂) ₂ OH	47.27±3.63	39.89±1.47	-	-
En2	CH(CH ₃) ₂	13.11±0.91	10.60±0.84	-	-
En3	C(CH ₃) ₃	22.88±1.56	17.28±0.87	-	-
En5	3,4-диметилфенил	20.46±0.64	61.39±2.03	13.38±0.43	20.29±0.67
En6	4-нитрофенил	>128	>128	100.57±30.11	118.86±3.62
En7	2,3-дихлорфенил	126.11±0.80	>128	26.21±0.81	48.00±1.65
Эллиптицин*		0.45±0.04	0.46±0.03	0.21±0.01	0.41±0.02

[*] Положительный контроль.

Результаты показали, что тиосемикарбазоны проявляют заметную по сравнению с эллиптицином цитотоксическую активность в отношении протестированных линий раковых клеток. Обнаружено, что по сравнению с четырьмя протестированными клеточными линиями, большинство исследуемых веществ оказывают наилучшее противораковое действие на две клеточные линии: клетки рака легких (A549) и клетки плоскоклеточной карциномы полости рта (KB).

Так, для тиосемикарбазона **Tn2** концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) по отношению к клеткам KB составила 1.43 μM , а по отношению к клеткам A549 – 3.45 μM ; для тиосемикарбазона **Tn5** IC₅₀(KB) =

1.92 μM и $\text{IC}_{50}(\text{A549}) = 1.84 \mu\text{M}$. По отношению к линии KB хорошую активность продемонстрировало соединение **Tn6**. Наименьшая активность по отношению к линии KB оказалась у тиосемикарбазона **Tn3**. Наиболее устойчивой к действию исследованных тиосемикарбазонов линией клеток оказалась линия клеток рака печени (Hep-G2). По отношению к ней наиболее активными оказались **Tn1**, **Tn5**, и **Tn9**, но для этих соединений IC_{50} примерно в 30 раз больше, чем для эталона сравнения. Лучшее действие по отношению к линии клеток MCF-7 отмечено для **Tn2** и **Tn8**, IC_{50} примерно в 20 раз превышает данное значение для эллиптицина.

Изученные енаминокетоны **En(1-7)** показали значительно меньшую антипролиферативную активность в сравнении с тиосемикарбазонами. Исключение составляет **En2**, который оказался наиболее активным из всех соединений по отношению к клеткам рака печени ($\text{IC}_{50} = 13.11 \mu\text{M}$) и к клеткам рака молочной железы (MCF-7, $\text{IC}_{50} = 10.60 \mu\text{M}$). В целом, енаминокетоны, синтезированные из алифатических аминов, обладают более высокой противораковой активностью, чем енаминокетоны, синтезированные из ароматических аминов. Соединения **En6** ($\text{IC}_{50} > 128$ (Hep-G2), > 128 (MCF-7), $= 100.57$ (KB), и $118.86 \mu\text{M}$ (A549)) и **En7** ($\text{IC}_{50} = 126.11$ (Hep-G2), > 128 (MCF-7), 26.21 (KB), и $48.00 \mu\text{M}$ (A549)), содержащие электроноакцепторные группы в фенильном кольце, такие как хлор и нитрогруппу, показали самую низкую противораковую активность *in vitro* по сравнению другими соединениями ко всем клеточным линиям.

Таким образом, лучшую противораковую активность *in vitro* продемонстрировали тиосемикарбазоны **Tn1**, **Tn2**, **Tn5**, **Tn6**, **Tn8**, и **Tn9** в отношении линий раковых клеток KB и A549, исходя из этого они могут быть рекомендованы для дальнейшего тестирования в качестве противораковых препаратов.

3.6.2 Результаты тестирования антиоксидантной активности по системе DPPH

В этом исследовании антиоксидантную активность оценивали с использованием 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (DPPH) [169, 170]. Величины полумаксимальной эффективной концентрации для изученных соединений представлены в табл. 8. В качестве эталона сравнения использовали кверцетин.

Таблица 8. Результаты тестирования антиоксидантной активности тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En** (EC_{50} : Полумаксимальная эффективная концентрация, μM).

Соед.	R	EC_{50} (μM)
Tn1	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	>128
Tn2	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	80.69 ± 4.08
Tn3	H	92.76 ± 1.08
Tn5	<i>n</i> -толил	26.29 ± 1.70
Tn6	2,4-диметилфенил	64.00 ± 2.50
Tn8	CH_2Ph	>128
Tn9	$(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$	>128
En1	$(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	>128
En2	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	>128
En3	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	>128
En5	3,4-диметилфенил	>128
En6	4-нитрофенил	>128
En7	2,3-дихлорфенил	>128
Кверцетин*		9.97 ± 0.25

[*] Положительный контроль.

Тиосемикарбазоны и енаминокетоны подвергали испытанию при максимальной концентрации $128 \mu\text{M}$. В результате проведенных исследований установлено, что соединения семейства енаминокетонов не проявляют антиоксидантной активности ($EC_{50} > 128 \mu\text{M}$). Некоторые тиосемикарбазоны обладают умеренной антиоксидантной способностью. Тиосемикарбазон **Tn5** обладает самой высокой антиоксидантной способностью с $EC_{50} = 26.29 \mu\text{M}$. Соединения **Tn(2, 3, 6)** проявляли слабую антиоксидантную активность, при значениях EC_{50} соответственно: 80.69 , 92.76 , и $64.00 \mu\text{M}$. Соединения **Tn(1, 8, 9)**

не проявляли антиоксидантной активности в исследованной области концентраций ($EC_{50} > 128 \mu M$).

3.7 Прогнозирование фармакокинетики и прогноз токсичности (ADMET)

Исследуемые соединения прошли предиктивный анализ *in silico*. По его результатам были спрогнозированы параметры ADMET (всасывание, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность) [168, 170]. Помимо этого, проводилась оценка рисков побочных эффектов – мутагенных и онкогенных.

Фармакокинетические свойства

Расчеты ADMET были выполнены с использованием онлайн-программного обеспечения PreADMET (для оценки всасывания в кишечнике человека, **НИА**), и SwissADME (для оценки следующих параметров: количество акцепторов водородной связи, **a-acc**; количество доноров водородной связи, **a-don**; площадь топологической полярной поверхности, **TPSA**; количество вращающихся связей, **b-rotN**; логарифм коэффициента распределения соединения между n-октанолом и водой, **LogP**; нарушения правила Липински; и правила Вебера). Данные ADMET указывают на то, что для этих соединений прогнозируется хорошее всасывание в кишечнике человека ($НИА = 90.10\text{--}97.20\%$) (табл. S11 Приложения). Согласно результатам, представленным в таблице S11 Приложения, видно, что соединения соответствуют всем правилам лекарственного подобия (правилу Липински и правилу Вебера), ни для одного из них не наблюдается нарушение более одного критерия ADMET. А именно: согласно правилу Липински, молекулярная масса ≤ 500 , количество акцепторов водородной связи **a-acc** ≤ 10 , количество доноров водородных связей **a-don** ≤ 5 , коэффициент распределения октанол/вода **LogP** ≤ 5 [172]. Также, согласно правилу Вебера, число вращающихся связей **b-rotN** не превышает 10, а площадь полярной поверхности **TPSA** $\leq 140 \text{ \AA}^2$ [173, 174].

Прогноз токсичности

Помимо оценки фармакокинетических свойств, так же было проведено прогнозирование токсичности изучаемых соединений с помощью программы SwissADME: тест Эймса, тест на канцерогенность и тест на ингибирование ген специфических калиевых каналов сердца (hERG).

Тест Эймса показывает, может ли данное соединение вызывать мутации в ДНК организма. Говоря более формально, это биологический анализ для оценки мутагенного потенциала соединений. Положительный тест указывает на то, что соединение является мутагенным [175, 176]. Тест на канцерогенность жизненно важен для определения того, вызовет ли новое лекарство рак у людей во время доклинических исследований, однако это определение часто осложняется многими переменными, включая сложность канцерогенеза и имеющиеся различия в кинетике опухоли между животными и человеческими моделями [177]. Тест ингибирования hERG также важен при открытии и разработке новых лекарств, потому что ряд клинически успешных препаратов на рынке имеют тенденцию ингибировать hERG и создавать сопутствующий риск внезапной смерти в качестве побочного эффекта [178]. Результаты оценки токсичности соединений представлены в таблице S12 Приложения.

Исследованные тиосемикарбазоны не являются ни мутагенными, ни канцерогенными и обладают умеренным ингибированием hERG (за исключением **Tn3**, который сильно ингибирует hERG). Тиосемикарбазоны **Tn4**, **Tn8**, **Tn9**, хотя и не вызывает мутации, но классифицируются как неоднозначные молекулы в тесте ингибирования hERG. Это означает, что есть две возможности: во-первых, молекула может ингибировать hERG; а вторая заключается в том, что молекула не представляет опасности для hERG. Большинство енаминокетонов не являются мутагенными, но являются канцерогенными и обладают умеренным ингибирующим потенциалом в отношении hERG.

3.8 Моделирование методом молекулярного докинга

Для интерпретации противораковых свойств изученных соединений был проведен молекулярный докинг соединений с активным центром рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). EGFR – трансмембранный белок, принадлежащим к семейству рецепторных ингибиторов тирозинкиназы ErbB [179]. Его избыточная экспрессия приводит к неконтролируемому делению клеток и связана с развитием широкого спектра опухолей. Мутации, приводящие к сверхэкспрессии EGFR, связаны с такими видами рака, как карцинома легкого (40% случаев), анальный рак [180], глиобластома (50%) и эпителиальные опухоли (80–100%) [181]. EGFR отвечает и играет важную роль в развитии метастазирования гепатоцеллюлярной карциномы [182]. Ранее было установлено, что препарат эрлотиниб может выступать ингибитором тирозинкиназы и может быть использован для блокирования EGFR за счет связывания с тирозинкиназным доменом EGFR (EGFR-TK).

Энергия связи и характер связывания тиосемикарбазонов и енаминокетонов с EGFR-TK в сравнении с эрлотинибом были определены с помощью программного комплекса MOE 2014.09 [168]. Кристаллографическая структура домена тирозинкиназы EGFR со связанным эрлотинибом была получена из Базы данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB), идентификатор структуры в PDB: 4HJO.

3.8.1 Оценка модели (re-docking)

Полученный из PDB EGFR (pdb:4HJO) содержит связанную молекулу эрлотиниба. Перед моделированием связывания молекула эрлотиниба удалялась из модели. Проверка корректности белковой мишени и параметров программного обеспечения проверялась повторным докингом молекулы эрлотиниба. Разница в исходном положении эрлотиниба в рецепторе (исходный лиганд) и после проведенного докинга была незначительной (среднеквадратичное отклонение, RMSD составляет 1.13 Å (табл. S13 Приложения), что менее 2.0 Å). На рисунке 3.51 показаны наложенные

конформации молекулы эрлотиниба в исходной структуре и в результате повторного докинга. Это показывает, что молекулярная модель активного центра белковой мишени EGFR может применяться для определения взаимодействий с новыми лигандами [183, 184].

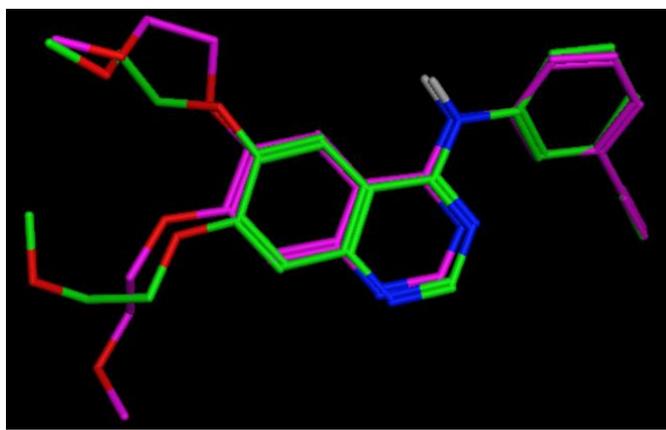


Рисунок 3.51. Конформация молекулы эрлотиниба в рецепторе EGFR: исходное положение эрлотиниба (зеленый) и после повторного докинга (розовый).

3.8.2 Результаты молекулярного докинга тиосемикарбазонов и енаминокетонов

Значения энергии взаимодействия (S), а также силы Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, водородных связей, $\pi \cdots \text{H}-\text{C}$ взаимодействий между белком-мишенью EGFR с тиосемикарбазонами и енаминокетонами в сравнении с эрлотинибом представлены в таблице S13 Приложения. Для всех молекул величина стандартного отклонения не превышает 2.0 Å.

Результаты молекулярного докинга свидетельствуют, что тиосемикарбазоны проявляют более сильное ингибирующее действие, образуя более прочные комплексы с активным центром домена тирозинкиназы EGFR, чем енаминокетоны. Энергии связи этих соединений лежат в диапазоне от -8.13 до -10.45 ккал/моль. Наибольший вклад в энергию связи соединений вносит образование водородных связей между лигандом и мишенью. Например, на рис. 3.52 показана конформация соединения **Tn5** в комплексе с белком EGFR. Соединение **Tn5** (энергия связи -10.26 ккал/моль) образует две водородные

связи с аминокислотными фрагментами: NH-группа гидразонного фрагмента взаимодействует с атомом кислорода аминокислоты треонина (остаток Thr830, длина водородной связи $l = 2.90 \text{ \AA}$) и C=S-группа тиосемикарбазона является акцептором водородной связи $C=S \cdots H-C$ с лизином (остаток Lys721, $l = 3.64 \text{ \AA}$).

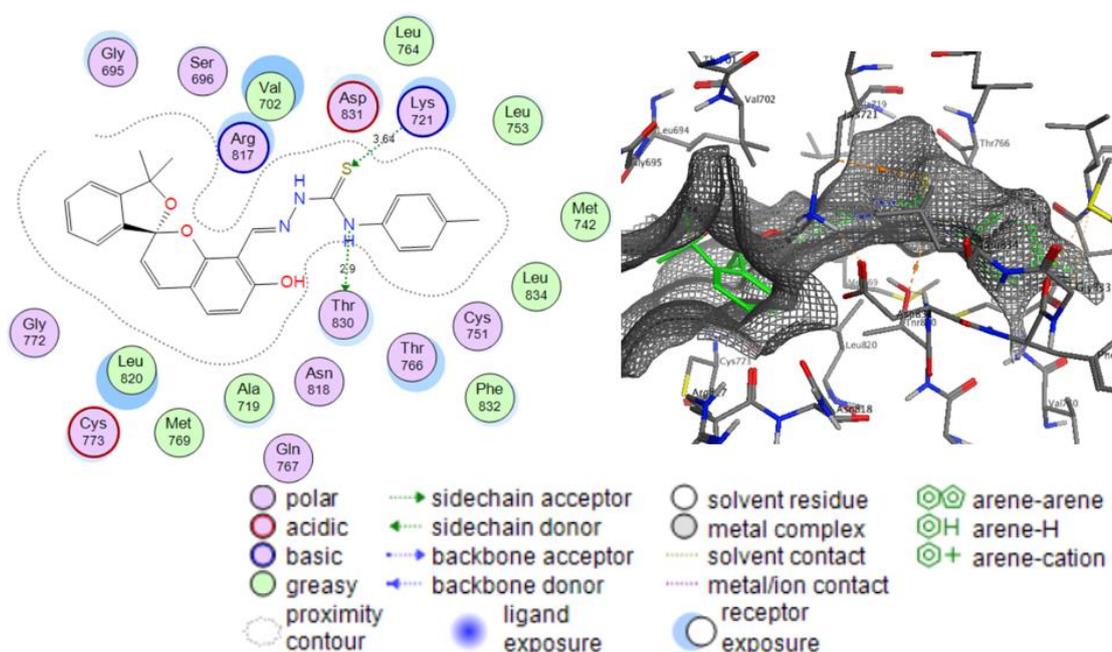


Рисунок 3.52. Конформация тиосемикарбазона **Tn5** ($R=n$ -толил) в комплексе с рецептором EGFR.

Соединение **Tn2** образует две водородные связи: NH гидразонного фрагмента взаимодействует с кислородом карбоксилатной группы аспарагина (остаток Asp831, $l = 2.94 \text{ \AA}$); OH группа тиосемикарбазона **Tn2** взаимодействует с группой HS цистеина (остаток Cys773, $l = 3.99 \text{ \AA}$). Так же имеется взаимодействие $\pi \cdots H-C$ типа между CH группой аминокислоты (Arg817, $l = 3.90 \text{ \AA}$) и ароматическим кольцом бензопиранового фрагмента тиосемикарбазона. Соединение **Tn8** (энергия связи -10.07 ккал/моль) так же образует две водородные связи, NH-группа гидразонного фрагмента взаимодействует с атомом кислорода аминокислоты аспарагина (остаток Asn818, $l = 3.19 \text{ \AA}$) и атомом кислорода аспарагиновой кислоты (остаток Asp831, $l = 2.94 \text{ \AA}$) (рис. 3.53). Среди тиосемикарбазонов наименьшее

взаимодействие с EGFR (с показателем докинга $S = -8.13$ ккал/моль) наблюдается для соединения **Tn3**, что определяет его наименьшую биологическую активность.

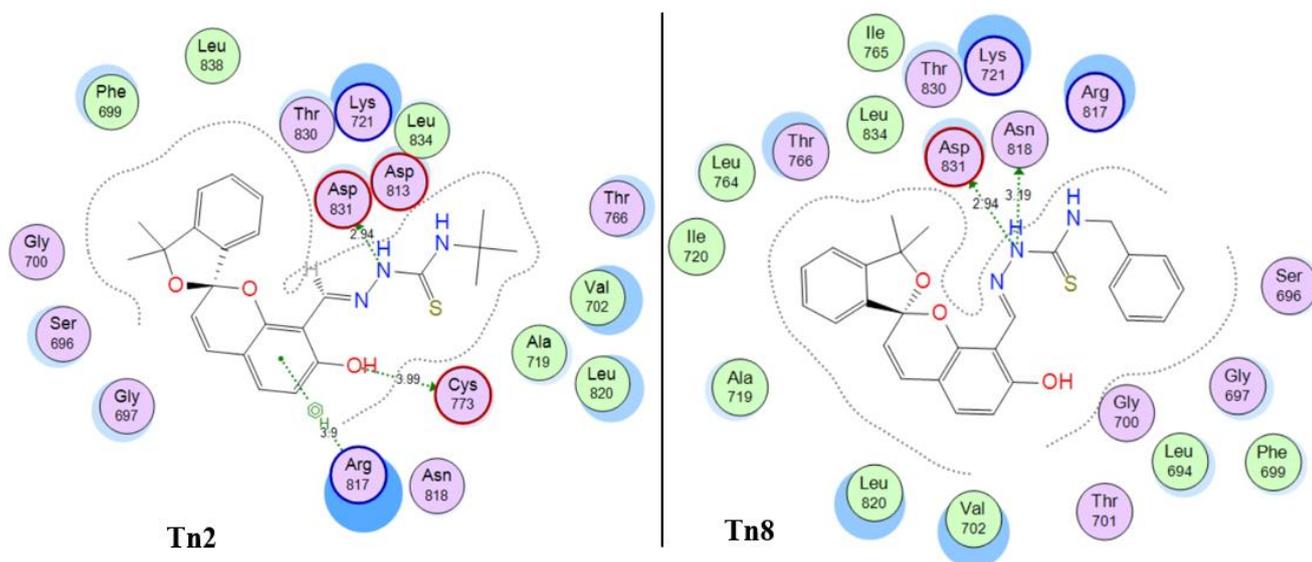


Рисунок 3.53. Природа взаимодействия тиосемикарбазонов **Tn2** ($R=C(CH_3)_3$) и **Tn8** ($R=CH_2Ph$) с рецептором EGFR.

Таким образом, тиосемикарбазоны **Tn2**, **Tn5**, и **Tn8** характеризуются наибольшими величинами энергии взаимодействия с белком-мишенью, и по величине энергии связи приближаются к эрлотинибу. Водородные связи между тиосемикарбазонным фрагментом ($-NHCSNH-N=C-$) и соответствующими аминокислотными остатками белка вносят наиболее важный вклад в усиление их ингибирующей активности по отношению к EGFR.

В общем, для енаминокетонов **En(1–7)** энергия связи, вычисленная с помощью молекулярного докинга, заметно меньше, чем у тиосемикарбазонов, что хорошо коррелирует с меньшей биологической активностью этой группы соединений. Енаминокетон **En5** обладает наибольшим связыванием ($S = -8.65$ ккал/моль) с рецептором EGFR. Это соединение взаимодействует с четырнадцатью аминокислотами по типу Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и образует одну водородную связь между экзоциклическим атомом кислорода енаминакетона и NH группой метионина (остаток Met769, $l = 2.99$ Å). Кроме

того, существует взаимодействие $\pi \cdots \text{H}-\text{C}$ типа между СН группой аминокислоты (Arg817, $l = 4.20 \text{ \AA}$) и ароматическим кольцом енаминокетона (рис. 3.54).

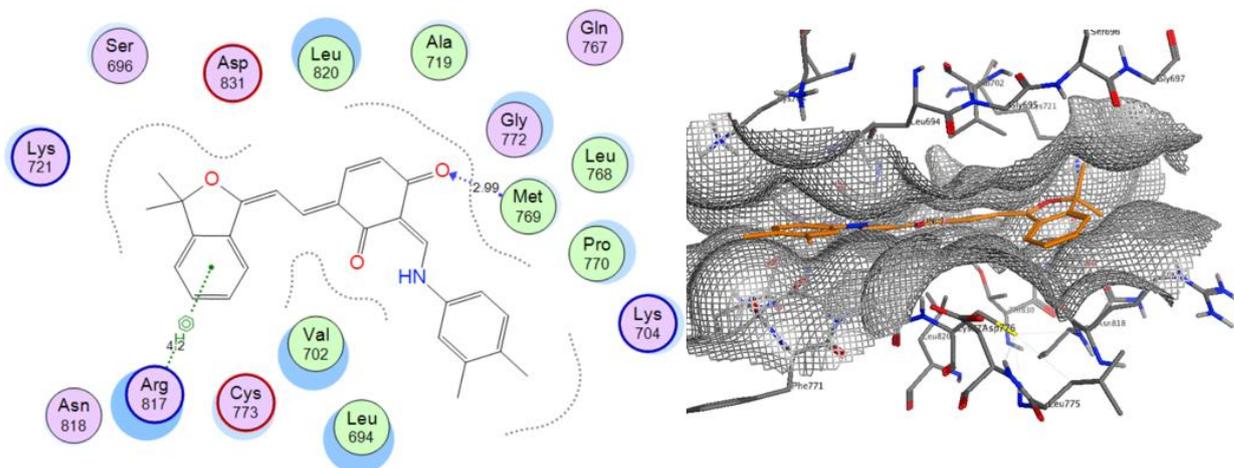


Рисунок 3.54. Природа взаимодействия енаминокетона **En5** с рецептором EGFR.

Енаминакетон **En3** характеризуется наименьшим связыванием ($S = -7.97$ ккал/моль). На рис. 3.55 показано, что соединение **En3** образует пятнадцать слабых Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и одну водородную связь (между кислородом енаминокетона и ОН-группой аминокислоты треонина, остаток Thr766, $l = 2.81 \text{ \AA}$).

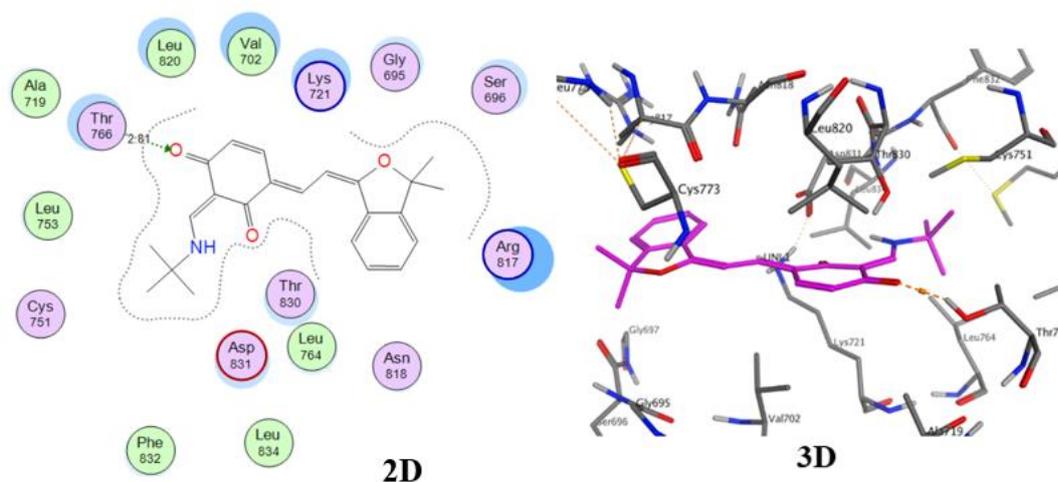


Рисунок 3.55. Двумерные и трехмерные взаимодействия соединения **En3** ($\text{R}=\text{C}(\text{CH}_3)_3$) с рецептором EGFR.

Единственную водородную связь образуют и соединения **En(3–7)**. Две водородные связи образуются только **En1** и **En2**, но их характеристики (длина связи) далеки от оптимальных, что свидетельствует об их малой прочности.

Оценка корреляции между энергией связи (S) и биологической активностью тиосемикарбазонов.

Была оценена корреляция между энергией связи S, вычисленной с помощью молекулярного докинга, и биологической активностью тиосемикарбазонов. Исследования показали, что существует корреляция между энергией связи, вычисленной с помощью процедуры молекулярного докинга, и противораковыми свойствами изученных тиосемикарбазонов, а именно, величиной полумаксимального ингибирования по отношению к клеточной линии рака KB (коэффициент корреляции $r = 0.84$). В частности, среди протестированных тиосемикарбазонов, соединение **Tn2** имеет характеризуется наибольшим взаимодействием с EGFR ($S = -10.45$ ккал/моль), а также имеет самое низкое значение IC_{50} в тесте *in vitro* по отношению к клеточной линии рака KB при $1.43 \mu\text{M}$. Тиосемикарбазон **Tn3** характеризуется наименьшим связыванием с EGFR ($S = -8.13$ ккал/моль) и соединение **Tn3** также меньше всего ингибирует линию раковых клеток KB со значением $IC_{50} = 20.00 \mu\text{M}$. Значения приведены в таблице S14 Приложения, график корреляционной зависимости S от $pIC_{50} = -\lg(IC_{50})$ показан на рисунке 3.56.

При исключении из ряда исследованных соединений в случае клеточной линии KB соединений тиосемикарбазона **Tn6** коэффициент корреляции составляет $r = 0.95$.

Однако энергия связывания, рассчитанная с помощью процедуры молекулярного докинга, и биологическая активность тиосемикарбазона по отношению к клеточной линии рака MCF-7 в меньшей степени коррелируют друг с другом (коэффициент корреляции $r = 0.69$) (рис. 3.56).

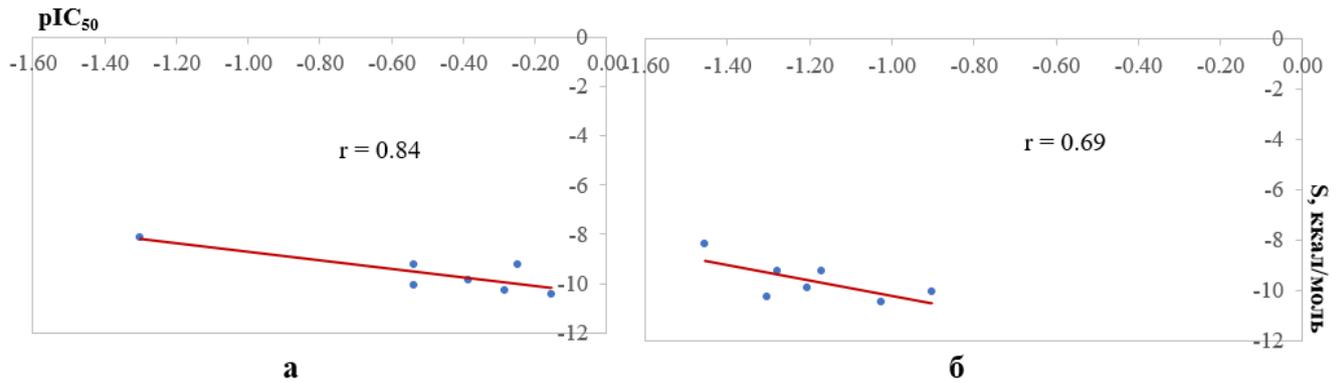


Рисунок 3.56. Корреляция между энергией связи S (ккал/моль) и $pIC_{50} = -\lg(IC_{50})$ для тиосемикарбазонов по отношению к раковой клеточной линии KB (а) и MCF-7 (б).

Таким образом, было показано, что результаты изучения *in vitro* противораковой активности к клеточной линии рака KB и MCF-7 согласуются с результатами модели докинга производных тиосемикарбазонов с рецептором EGFR. Это косвенно свидетельствует о правильном выборе белка-мишени, который определяет антипролиферативную активность тиосемикарбазонов в случае линий раковых клеток KB и MCF-7.

Заключение

1. Реакция 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2Н-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с рядом тиосемикарбазидов, ароматических и алифатических первичных аминов показала возможность получения на их основе новых полидентантных лигандных систем.
2. Продукты взаимодействия 3,3-диметил-7-гидрокси-8-формил-[2Н-1-бензопиран-2,1-[2]-оксаиндана] с тиосемикарбазидами существуют в спиропирановой изомерной форме. Продукты взаимодействия с аминами существуют в “открытой” мероцианиновой форме в виде плоских енаминокетонов.
3. Изучение комплексообразующих свойств соединений в растворе показало, что полученные соединения обладают способностью взаимодействовать с ионами переходных металлов, у которых комплексообразование с ионами Cu^{2+} происходит лучше всего. Для енаминокетонов взаимодействие с ионами Ni^{2+} , Co^{2+} не наблюдалось. Ионы переходных металлов вызывают изомеризацию бесцветной “закрытой” формы тиосемикарбазонов в кольцевую окрашенную форму с “открытым” формами.
4. Тиосемикарбазоны **Tn1** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) и **Tn8** ($\text{R}=\text{CH}_2\text{Ph}$) проявляют обратимые фотохромные свойства, для енаминокетонов **En1** ($\text{R}=(\text{CH}_2)_2\text{OH}$), **En2** ($\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) характерен обратный фотохромизм.
5. L-Глутатион (GSH) образует прочный молекулярный комплекс с “открытой” изомерной формой тиосемикарбазона **Tn8**. Разработаны спектрофотометрическая и кинетическая методики аналитического определения глутатиона с применением **Tn8** в качестве реагента.
6. Полученные соединения (7 тиосемикарбазонов и 6 енаминокетонов) подвергали скринингу в отношении четырех типичных линий раковых клеток человека, включая клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7, клетки рака печени Hep-G2, рака легких A549, и плоскоклеточной карциномы полости

рта KB. Тиосемикарбазоны обладают значительной антипролиферативной активностью в отношении всех линий раковых клеток, особенно клеток карциномы KB и клеток рака легкого A549. Соединения **Tn2**, **Tn5**, **Tn6**, и **Tn8** могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования антираковой активности. Для енаминокетонов антипролиферативная активность оказалась низкой.

7. Методом молекулярного докинга показано, что тиосемикарбазоны характеризуются большими по абсолютной величине значениями энергии связывания с рецептором EGFR (pdb id: 4HJO) по сравнению с енаминокетонами, причем наибольший вклад в энергию связи вносит образование водородных связей между тиосемикарбазонным фрагментом и аминокислотными остатками белка-мишени.

8. Установлена корреляция между величиной энергии связи тиосемикарбазонов с рецептором EGFR (pdb id: 4HJO) и противораковыми свойствами по отношению к линиям клеток KB и MCF-7. Более высокие по абсолютной величине значения энергии связывания тиосемикарбазонов согласуются с их большей цитотоксической активностью по сравнению с енаминокетонами.

Список литературы

1. Liao, B. The carbon nanoparticles grafted with copolymers of styrene and spiropyran with reversibly photoswitchable fluorescence / B. Liao, W. Wang, P. Long, X. Deng, B. He, Q. Liu, S. Yi // *Carbon*. –2015. – Vol. 91. – P. 30–37.
2. Zhu, M. Q. Spiropyran-based photochromic polymer nanoparticles with optically switchable luminescence / M. Q. Zhu, L. Zhu, J. J. Han, W. Wu, J. K. Hurst, A. D. Li // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128, – № 13. – С. 4303–4309.
3. Qu, L. Solid-state photochromic molecular switches based on axially chiral and helical spiropyrans / L. Qu, X. Xu, J. Song, D. Wu, L. Wang, W. Zhou, X. Zhou, H. Xiang // *Dyes and Pigments*. – 2020. –Vol. 181. – P. 108597.
4. Lukyanov, B. S. Spiropyrans: synthesis, properties, and application / B. S. Lukyanov, M. B. Lukyanova // *Chemistry of Heterocyclic compounds*. –2005. – Vol. 41, – № 3. – P. 281–311.
5. Zhang, H. Photocontrol of charge injection/extraction at electrode/semiconductor interfaces for high-photoresponsivity organic transistors / H. Zhang, H. Chen, W. Ma, J. Hui, S. Meng, W. Xu, D. Zhu, X. Guo // *Journal of Materials Chemistry C*. – 2016. – Vol. 4, – № 23. – P. 5289–5296.
6. Hogley, J. Ultrafast photo-dynamics of a reversible photochromic spiropyran / J. Hogley, U. Pfeifer-Fukumura, M. Bletz, T. Asahi // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2002. – Vol. 106, – № 10. – С. 2265–2270.
7. Klajn, R. Spiropyran-based dynamic materials / R. Klajn // *Chemical Society Reviews*. – 2014. – Vol. 43, – № 1. – P. 148–184.
8. Минкин, В. И. Фотоконтролируемые молекулярные переключатели на основе бистабильных спироциклических органических и координационных соединений / В. И. Минкин // *Успехи химии*. – 2013. – Т. 82, – № 1. – С. 1–26.
9. Минкин, В. И. Бистабильные органические, металлоорганические и

- координационные соединения для молекулярной электроники и спинтроники / В. И. Минкин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2008. – № 4. – С. 673–703.
10. Nahain, A. A. Photoresponsive fluorescent reduced graphene oxide by spiropyran conjugated hyaluronic acid for in vivo imaging and target delivery / A. A. Nahain, J. E. Lee, J. H. Jeong, S. Y. Park // *Biomacromolecules*. – 2013. – Vol. 14, – № 11. – P. 4082–4090.
 11. Minkin, V. I. Photoswitchable molecular systems based on spiropyrans and spirooxazines / V. I. Minkin // *Molecular switches*. – 2011. – Vol. 1. – P. 37–80.
 12. Bulanov, A. O. A novel chelatofore functionalized spiropyran of the 2-oxaindane series / A. O. Bulanov, I. N. Shcherbakov, Y. P. Tupolova, L. D. Popov, V. V. Lukov, V. A. Kogan, P. A. Belikov // *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. – 2009. – Vol. 65, – № 12. – P. o618–o620.
 13. Decker, H. Uber cyclische Oxoniumsalze aus Dicumarketon und uber Spiropyranderivate / H. Decker, H. Felser // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. – 1908. – Vol. 41, – № 2. – P. 2997–3007.
 14. Berman, E. Photochromic spiropyrans. I. The effect of substituents on the rate of ring closure / E. Berman, R. E. Fox, F. D. Thomson // *Journal of the American Chemical Society*. – 1959. – Vol. 81, – № 21. – P. 5605–5608.
 15. Mustafa, A. The chemistry of spiropyrans / A. Mustafa // *Chemical Reviews*. – 1948. – Vol. 43, – № 3. – С. 509–523.
 16. Haley, N. F. 3-Methyl-2, 1-benzisoxazolium, benzisothiazolium, and indazolium salts as new active-methyl compounds / N. F. Haley // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1978. – Vol. 43, – № 6. – P. 1233–1237.
 17. Minkin, V. I. Photo, thermo, solvato, and electrochromic spiroheterocyclic compounds / V. I. Minkin // *Chemical reviews*. – 2004. – Vol. 104, – № 5. – P.

- 2751–2776.
18. Bulanov, A. O. Synthesis, IR, UV/vis-, ¹H NMR and DFT study of chelatophore functionalized 1, 3-benzoxazinone spiropyrans / A. O. Bulanov, L. D. Popov, I. N. Shcherbakov, V. A. Kogan // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2008. – Vol. 71, – № 3. – P. 1146–1152.
 19. Crano, J. C. Organic photochromic and thermochromic compounds: volume 2: physicochemical studies, biological applications, and thermochromism / J. C. Crano, R. J. Guglielmetti // Springer, 2002.
 20. Bertelson, R. Techniques of Chemistry: Photochromism / R. Bertelson // Brown GMEd. NY: Wiley, 1971.
 21. Xia, H. Advances in spiropyrans/spirooxazines and applications based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) with fluorescent materials / H. Xia, K. Xie, G. Zou // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, – № 12. – P. 2236.
 22. Schwartz, H. A. Tracking the light-induced isomerization processes and the photostability of spiropyrans embedded in the pores of crystalline nanoporous MOFs via IR spectroscopy / H. A. Schwartz, D. Schaniel, U. Ruschewitz // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2020. – Vol. 19, – № 10. – P. 1433–1441.
 23. Seiler, V. K. A structural analysis of spiropyran and spirooxazine compounds and their polymorphs / V. K. Seiler, N. Tumanov, K. Robeyns, J. Wouters, B. Champagne // *Crystals*. – 2017. – Vol. 7, – № 3. – P. 84.
 24. Pomogaev, V. A. Photo-Transformation Trajectories of Nitro-Spiropyran in Hybrid Compounds with [60] Fullerene / V. A. Pomogaev, P. V. Avramov // *J. Phys. Chem. C*. – 2019. – Vol. 123, – № 30. – P. 18215–18221.
 25. Guglielmetti, R. Spiropyrans and related compounds / R. Guglielmetti // *Studies in organic chemistry*. – 1990. – Vol. 40. – P. 855–878.

26. Lukyanov, B. S. Solid state photochromism of spiropyrans / B. S. Lukyanov, A. V. Metelitsa, N. A. Voloshin, Y. S. Alexeenko, M. B. Lukyanova, G. T. Vasilyuk, S. A. Maskevich, E. L. Mukhanov // *International Journal of Photoenergy*. – 2005. – Vol. 7, – № 1. – P. 17–22.
27. Bulanov, A. Novel hydrazone derivatives of 7-hydroxy-3,3-dimethyl-3H-spiro[chromene-2,1-isobenzofuran]-8-carbaldehyde / A. Bulanov, I. N. Shcherbakov, L. D. Popov, E. Y. Shasheva, P. A. Belikov, Z. A. Starikova // *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. – 2011. – Vol. 67, – № 3. – P. o85–o88.
28. Nikolaeva, O. G. Synthesis and photochromic properties of spiropyrans containing a fused benzopyranone fragment / O. G. Nikolaeva, E. B. Gaeva, E. N. Shepelenko, A. V. Tsukanov, A. V. Metelitsa, B. S. Lukyanov, A. D. Dubonosov, V. A. Bren, V. I. Minkin // *Russian journal of organic chemistry*. – 2009. – Vol. 45, – № 7. – P. 1091–1097.
29. Solov'eva, E. V. New photochromic spirobenzofuran-isobenzofurans / E. V. Solov'eva, N. A. Voloshin, S. O. Bezuglyi // *Chemistry of heterocyclic compounds*. – 2010. – Vol. 46, – № 4. – P. 500–501.
30. Zakhs, E. R. Synthesis and properties of spiropyrans that are capable of reversible opening of the pyran ring / E. R. Zakhs, V. M. Martynova, L. S. Efros // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 1979. – Vol. 15, – № 4. – P. 351–372.
31. Minkin, V. I. Photochromic characteristics of spirocyclic organic and coordination compounds / V. I. Minkin // *Theoretical and Experimental Chemistry*. – 1995. – Vol. 31, – № 3. – P. 140–152.
32. Shao, N. Spiropyran-based fluorescent anion probe and its application for urinary pyrophosphate detection / N. Shao, H. Wang, X. D. Gao, R. H. Yang, W. H. Chan // *Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 82, – № 11. – P. 4628–4636.

33. Babazadeh-Mamaqani, M. Optical chemosensors based on spiropyran-doped polymer nanoparticles for sensing pH of aqueous media / M. Babazadeh-Mamaqani, H. Roghani-Mamaqani, A. Abdollahi, M. Salami-Kalajahi // *Langmuir*. – 2022. – Vol. 38, – № 30. – P. 9410–9420.
34. Bertelson, R. C. Organic Photochromic and Thermochromic Compounds: Volume 1: Photochromic Families. T. 1 / R. C. Bertelson // Springer Science & Business Media, 1999.
35. Shienok, A. I. One-step synthesis of novel photochemically bifunctional compounds of the spiropyran class / A. I. Shienok, N. A. Ivashina, L. S. Kol'tsova, N. L. Zaichenko // *Russian Chemical Bulletin*. – 2008. – Vol. 57, – № 11. – P. 2437–2439.
36. Халанский, К. Н. Синтез, строение и фотохромные свойства индолиновых спиропирано [3, 2-F] хинолинов с различными заместителями в индолиновом цикле / К. Н. Халанский, М. Б. Лукьянова, Е. Л. Муханов, А. В. Цуканов, И. В. Ожогин, С. О. Безуглый, В. В. Ткачёв, Б. С. Лукьянов // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 11-5. – С. 1249–1253.
37. Муханов, Е. Л. Разработка синтетических подходов к спиропиранам с модифицированным оксазиновым фрагментом / Е. Л. Муханов, И. В. Ожогин, С. О. Безуглый, Б. С. Лукьянов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 6. – С. 717–717.
38. Wojtyk, J. T. C. Modulation of the spiropyranmerocyanine reversion via metal-ion selective complexation: trapping of the transient cis-merocyanine / J. T. C. Wojtyk, P. M. Kazmaier, E. Buncel // *Chemistry of materials*. – 2001. – Vol. 13, – № 8. – P. 2547–2551.
39. Ozhogin, I. V. Synthesis, structure and photochromic properties of novel highly functionalized spiropyrans of 1, 3-benzoxazin-4-one series / I. V. Ozhogin, V. V. Tkachev, B. S. Lukyanov, E. L. Mukhanov // *Journal of Molecular Structure*. –

2018. – Vol. 1161. – P. 18–25.
40. Popov, L. D. Synthesis of new spiropyranes and study of the effect of the nature of substituents on their photochromism and complexation / L. D. Popov, A. O. Bulanov, E. A. Raspopova, A. N. Morozov, I. N. Scherbakov, O. I. Kobeleva, T. M. Valova, V. A. Barachevskii // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2013. – Vol. 83, – № 6. – P. 1111–1116.
 41. Cardano, F. Spiropyranes for light-controlled drug delivery / F. Cardano, E. Del Canto, S. Giordani // *Dalton Transactions*. – 2019. – Vol. 48, – № 41. – P. 15537–15544.
 42. Grogan, C. Silicon microcantilever sensors to detect the reversible conformational change of a molecular switch, spiropyran / C. Grogan, G. Amarandei, S. Lawless, F. Pedreschi, F. Lyng, F. Benito-Lopez, R. Raiteri, L. Florea // *Sensors*. – 2020. – Vol. 20, – № 3. – P. 854.
 43. Bayrakçeken, F. Photochromism and thermochromism of trimethylindolinobenzospiropyran in methanol / F. Bayrakçeken, A. Ü. Keskin // *Asian Journal of Spectroscopy*. – 2003. – Vol. 7, – № 3. – P. 137–141.
 44. Kortekaas, L. The evolution of spiropyran: fundamentals and progress of an extraordinarily versatile photochrome / L. Kortekaas, W. R. Browne // *Chemical Society Reviews*. – 2019. – Vol. 48, – № 12. – P. 3406–3424.
 45. Berton, C. Thermodynamics and kinetics of protonated merocyanine photoacids in water / C. Berton, D. M. Busiello, S. Zamuner, E. Solari, R. Scopelliti, F. Fadaei-Tirani, K. Severin, C. Pezzato // *Chemical science*. – 2020. – Vol. 11, – № 32. – P. 8457–8468.
 46. Moldenhauer, D. Water-Soluble Spiropyranes with Inverse Photochromism and Their Photoresponsive Electrostatic SelfAssembly / D. Moldenhauer, F. Gröhn // *Chemistry–A European Journal*. – 2017. – Vol. 23, – № 16. – P. 3966–3978.

47. Remón, P. An acido- and photochromic molecular device that mimics triode action / P. Remón, S. M. Li, M. Grøtli, U. Pischel, J. Andreasson // *Chemical communications*. – 2016. – Vol. 52, – № 25. – P. 4659–4662.
48. Kortekaas, L. Proton-stabilized photochemically reversible E/Z isomerization of spiropyrans / L. Kortekaas, J. Chen, D. Jacquemin, W. R. Browne // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122, – № 24. – P. 6423–6430.
49. Irie, M. Proceedings of the 3rd International Symposium on Organic Photochromism-ISOP99-Part I of II-Fukuoka, Japan November 14-18, 1999 / M. Irie, K. Ichimura, K. Kimura // *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A*. – 2000. – Vol. 344. – P. VII–VII.
50. Gal'bershtam, M. A. Photochromic properties of some N-substituted 3, 3-dimethyl-6-nitroindoline-2-spiro-2-2H-chromenes / M. A. Gal'bershtam, N. M. Przhivalgovskaya, O. R. Khrolova, I. B. Lazarenko, G. K. Bobyleva, N. N. Suvorov // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 1977. – Vol. 13, – № 12. – P. 1309–1313.
51. Gal'bershtam, M. A. Synthesis of 3-acylsubstituted indoline spiropyran / M. A. Gal'bershtam, N. N. Artamonova, N. P. Samoiloa // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 1975. – Vol. 11, – № 2. – P. 167–172.
52. Samanta, D. Reversible chromism of spiropyran in the cavity of a flexible coordination cage / D. Samanta, D. Galaktionova, J. Gemen, L. J. W. Shimon, Y. Diskin-Posner, L. Avram, P. Král, R. Klajn // *Nature communications*. – 2018. – Vol. 9, – № 1. – P. 1–9.
53. Zakharova, M. I. Quantitative investigations of cation complexation of photochromic 8-benzothiazole-substituted benzopyran: towards metal-ion sensors / M. I. Zakharova, C. Coudret, V. Pimienta, J. C. Micheau, S. Delbaere, G. Vermeersch, A. V. Metelitsa, N. Voloshin, V. I. Minkin // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2010. – Vol. 9, – № 2. – P. 199–207.

54. Chibisov, A. K. Complexes of spiropyran-derived merocyanines with metal ions: relaxation kinetics, photochemistry and solvent effects / A. K. Chibisov, H. Görner // *Chemical Physics*. – 1998. – Vol. 237, – № 3. – P. 425–442.
55. Atabekyan, L. S. Laser flash photolysis of spiropyran in the presence of metal ions in solution / L. S. Atabekyan, A. K. Chibisov // *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science*. – 1988. – Vol. 37, – № 10. – P. 2017–2023.
56. Stubing, D. Crowned spiropyran fluoroionophores with a carboxyl moiety for the selective detection of lithium ions / D. B. Stubing, S. Heng, A. D. Abell // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2016. – Vol. 14, – № 15. – P. 3752–3757.
57. Alekseenko, Y. S. New photochromic bispiropyran / Y. S. Alekseenko, A. O. Bulanov, Y. A. Sayapin, A. S. Alekseenko, B. S. Luk'yanov, B. B. Safoklov // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2002. – Vol. 38, – № 9. – P. 1152–1153.
58. Ortica, F. Photokinetic behaviour of biphotochromic supramolecular systems: Part 2. A bis-benzo-[2H]-chromene and a spirooxazine–chromene with a (Z-) ethenic bridge between each moiety / F. Ortica, D. Levi, P. Brun, R. Guglielmetti, U. Mazzucato, G. Favaro // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2001. – Vol. 139, – № 2/3. – P. 133–141.
59. Bulanov, A. O. Binuclear copper (II) complexes with hydrazones containing spiropyran fragment / A. O. Bulanov, B. S. Lukyanov, V. A. Kogan, V. V. Lukov // *Russian Journal of Coordination Chemistry*. – 2003. – Vol. 29, – № 9. – P. 658–659.
60. Bouas-Laurent, H. Organic photochromism (IUPAC technical report) / H. Bouas-Laurent, H. Dürr // *Pure and Applied Chemistry*. – 2001. – Vol. 73, – № 4. – P. 639–665.
61. Collin, J. P. Towards molecular machines and motors / P. Collin, J. M. Kern, L.

- Raehm, J. P. Sauvage // *Molecular Switches*. – 2001. – Vol. 8. – P. 2.
62. Vikova, M. Alternative UV sensors based on color-changeable pigments / M. Vikova, M. Vik // *Advances in Chemical Engineering and Science*. – 2011. – Vol. 1, – № 04. – P. 224.
63. Aldoshin, S. M. Spiropyran: structural features and photochemical properties / S. M. Aldoshin // *Russian Chemical Reviews*. – 1990. Vol. 59, – № 7. – P. 663.
64. Gehrtz, M. Photochromic forms of 6-nitrobenzospiropyran. Emission spectroscopic and ODMR investigations / M. Gehrtz, C. Bräuchle, J. Voitleander // *Journal of the American Chemical Society*. – 1982. – Vol. 104, – № 8. – P. 2094–2101.
65. Kalisky, Y. Dynamics of the spiropyranmerocyanine conversion in solution / Y. Kalisky, T. E. Orłowski, D. J. Williams // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1983. – Vol. 87, – № 26. – P. 5333–5338.
66. Kholmanskii, A. S. The photochemistry and photophysics of spiropyran / A. S. Kholmanskii, K. M. Dyumaev // *Russian Chemical Reviews*. – 1987. – Vol. 56, – № 2. – P. 136.
67. Barachevskii, V. A. Photochromism and its Application / V. A. Barachevskii, G. I. Lashkov, V. A. Tsekhomskii // *Chemistry, Moscow*. – 1977. – P. 243.
68. Bulanov, A. O. Photochromic and Thermochromic Spiropyran. 22. Spiropyran of the 4-Oxo-3, 4-dihydro-3H-1, 3-benzoxazine Series Containing π -Accepting Substituents at Position 8' / A. O. Bulanov, B. B. Safoklov, B. S. Luk'yanov, V. V. Tkachev, V. I. Minkin, S. M. Aldoshin, Y. S. Alekseenko // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2003. – Vol. 39. – P. 315–317.
69. El'tsov A. V. Organic photochromes / A. V. El'tsov // Springer Science & Business Media, 2012.

70. Dürr H., Photochromism: molecules and systems / H. Dürr, H. Bouas-Laurent // Elsevier, 2003.
71. Crano, J. C. Organic Photochromic and Thermochromic Compounds Volume 2: Physicochemical Studies, Biological Applications, and Thermochromism / J. C. Crano, R. J. Guglielmetti // Springer, 2002.
72. Keum, S. R. Synthesis and characterization of bisindolinospirobenzopyrans, new photo-and thermochromic dyes / S. R. Keum, J. H. Lee, M. K. Seok // Dyes and pigments. – 1994. – Vol. 25, – № 1. – P. 21–9.
73. Минкин, В. И. Молекулярные компьютеры / В. И. Минкин // Научная мысль Кавказа. – 2004. – № 3. – С. 32–41.
74. Xie, N. Switchable two-photon imaging of RGD-functionalized polynorbornenes with enhanced cellular uptake in living cells / N. Xie, K. Feng, B. Chen, C. H. Tung, L. Z. Wu // New Journal of Chemistry. – 2016. – Vol. 40, – № 4. – P. 3252–3260.
75. Berkovic, G. Spiropyran and spirooxazines for memories and switches / G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss // Chemical reviews. – 2000. – Vol. 100, – № 5. – P. 1741–1754.
76. Kawata, S. Three-dimensional optical data storage using photochromic materials / S. Kawata, Y. Kawata // Chemical reviews. – 2000. – Vol. 100, – № 5. – P. 1777–1788.
77. Chen, Z. Light controlled reversible inversion of nanophosphor-stabilized pickering emulsions for biphasic enantioselective biocatalysis / Z. Chen, L. Zhou, W. Bing, Z. Zhang, Z. Li, J. Ren, X. Qu // Journal of the American Chemical Society. – 2014. – Vol. 136, – № 20. – P. 7498–7504.
78. Xiong, Y. Spiroanthoxazine switchable dyes for biological imaging / Y. Xiong, A. V. Jentsch, J. W. M. Osterrieth, E. Sezgin, I. V. Sazanovich, K. Reglinski, S.

- Galiani // *Chemical science*. – 2018. – Vol. 9, – № 11. – P. 3029–3040.
79. Howlader, P. Self-assembled Pd (II) barrels as containers for transient merocyanine form and reverse thermochromism of spiropyran / P. Howlader, B. Mondal, P. C. Purba, E. Zangrando, P. S. Mukherjee // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140, – № 25. – P. 7952–7960.
80. Razavi, B. Light-, temperature-, and pH-responsive micellar assemblies of spiropyran-initiated amphiphilic block copolymers: Kinetics of photochromism, responsiveness, and smart drug delivery / B. Razavi, A. Abdollahi, H. Roghani-Mamaqani, M. Salami-Kalajahi // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – Vol. 109. – P. 110524.
81. Seok, W. C. Photo-enhanced polymer memory device based on polyimide containing spiropyran / W. C. Seok, S. H. Son, T. K. An, S. H. Kim, S. W. Lee // *Electronic Materials Letters*. – 2016. – Vol. 12, – № 4. – P. 537–544.
82. Kubinyi, M. Metal complexes of the merocyanine form of nitrobenzospiran: Structure, optical spectra, stability / M. Kubinyi, O. Varga, P. Baranyai, M. Kállay // *Journal of Molecular Structure*. – 2011. – Vol. 1000, – № 1–3. – P. 77–84.
83. Николаева, О. Г. Фотохромные свойства спиропиранов на основе 5-гидрокси-4, 7-диметил-6-формилкумарина / О. Г. Николаева, Е. Н. Шепеленко, А. В. Цуканов, В. С. Козырев, А. В. Метелица, А. Д. Дубонос, В. А. Брень // *Вестник Южного научного центра РАН*. – 2010. – Т. 6, – № 3. – С. 12–17.
84. Yu, G. A spirobenzopyran-based multifunctional chemosensor for the chromogenic sensing of Cu^{2+} and fluorescent sensing of hydrazine with practical applications / G. Yu, Y. Cao, H. Liu, Q. Wu, Q. Hu, B. Jiang, Z. Yuan // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – Vol. 245. – P. 803–814.
85. Zhu, J. F. A colorimetric and fluorescent turn-on chemosensor operative in aqueous media for Zn^{2+} based on a multifunctionalized spirobenzopyran derivative

- / J. F. Zhu, H. Yuan, W. H. Chan, A. W. M. Lee // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2010. – Vol. 8, – № 17. – P. 3957–3964.
86. Guo, Z. Q. Highly selective visual detection of Cu (II) utilizing intramolecular hydrogen bond-stabilized merocyanine in aqueous buffer solution / Z. Q. Guo, W. Q. Chen, X. M. Duan // *Organic letters*. – 2010. – Vol. 12, – № 10. – P. 2202–2205.
87. Kim, I. Triazole-conjugated spiropyran: Synthesis, selectivity toward Cu (II), and binding study / I. Kim, D. C. Jeong, M. Lee, Z. H. Khaleel, C. Satheeshkumar, C. Song // *Tetrahedron Letters*. – 2015. – Vol. 56, – № 44. – P. 6080–6084.
88. Natali, M. Interaction studies between photochromic spiropyrans and transition metal cations: the curious case of copper / M. Natali, S. Giordani // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2012. – Vol. 10, – № 6. – P. 1162–1171.
89. Shao, N. Tunable photochromism of spirobenzopyran via selective metal ion coordination: an efficient visual and ratioing fluorescent probe for divalent copper ion / N. Shao, J. Y. Jin, H. Wang, Y. Zhang, R. H. Yang, W. H. Chan // *Analytical chemistry*. – 2008. – Vol. 80, – № 9. – P. 3466–3475.
90. Kho, Y. M. Spiropyran-isoquinoline dyad as a dual chemosensor for Co (II) and In (III) detection / Y. M. Kho, E. J. Shin // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, – № 9. – P. 1569.
91. Ma, G. Crown ethers with spiropyran units incorporated in the ring frameworks for pH-triggered ion recognition at the air–water interface / G. Ma, Q. Zhou, X. Zhang, Y. Xu, H. Liu // *New Journal of Chemistry*. – 2014. – Vol. 38, – № 2. – P. 552–560.
92. Sylvia, G. M. A rationally designed, spiropyran-based chemosensor for magnesium / G. M. Sylvia, A. M. Mak, S. Heng, A. Bachhuka, H. Ebendorff-Heidepriem, A. D. Abell // *Chemosensors*. – 2018. – Vol. 6, – № 2. – P. 17.

93. Wang, L. Selective sensing Ca^{2+} with a spiropyran-based fluorometric probe / L. Wang, Y. Yao, J. Wang, C. Dong, H. Han // *Luminescence*. – 2019. – Vol. 34, – № 7. – P. 707–714.
94. Heng, S. Photoswitchable calcium sensor: On–Off sensing in cells or with microstructured optical fibers / S. Heng, A. M. Mak, R. KostECKI, X. Zhang, J. Pei, D. B. Stubing, H. Ebendorff-Heidepriem, A. D. Abell // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – Vol. 252. – P. 965–972.
95. Xie, X. Light-controlled reversible release and uptake of potassium ions from ion-exchanging nanospheres / X. Xie, E. Bakker // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2014. – Vol. 6, – № 4. – P. 2666–2670.
96. Mistlberger, G. Photoresponsive ion extraction/release systems: dynamic ion optodes for calcium and sodium based on photochromic spiropyran / G. Mistlberger, X. Xie, M. Pawlak, G. A. Crespo // *Analytical chemistry*. – 2013. – Vol. 85, – № 5. – P. 2983–2990.
97. Hur, D. Y. A Fluorescent Chemosensor for Al^{3+} , and CN^- Based on a Dyad Bearing Rhodamine and Spiropyran Units / D. Y. Hur, E. J. Shin // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2015. – Vol. 36, – № 8. – P. 2027–2033.
98. Ren, J. Thermally stable merocyanine form of photochromic spiropyran with aluminum ion as a reversible photo-driven sensor in aqueous solution / J. Ren, H. Tian // *Sensors*. – 2007. – Vol. 7, – № 12. – P. 3166–3178.
99. Kho, Y. M. Detection of cyanide anion by zinc porphyrin-spiropyran dyad / Y. M. Kho, D. Y. Hur, E. J. Shin // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2016. – Vol. 37, – № 10. – P. 1728–1731.
100. Xia, H. A highly sensitive and reusable cyanide anion sensor based on spiropyran functionalized polydiacetylene vesicular receptors / H. Xia, J. Li, G. Zou, Q. Zhang, C. Jia // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2013. – Vol. 1, № 36. – P.

10713–10719.

101. Prakash, K. A substituted spiropyran for highly sensitive and selective colorimetric detection of cyanide ions / K. Prakash, P. R. Sahoo, S. Kumar // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – Vol. 237. – P. 856–864.
102. Kaiser, C. Proton-Transfer Dynamics of Photoacidic Merocyanines in Aqueous Solution / C. Kaiser, T. Halbritter, A. Heckel, J. Wachtveitl // *Chemistry–A European Journal*. – 2021. – Vol. 27, – № 35. – P. 9160–9173.
103. Tian, W. Colorimetric and fluorometric dual-mode detection of aniline pollutants based on spiropyran derivatives / W. Tian, Y. Xue, J. Tian, P. Gong, J. Dai, X. Wang, Z. Zhu // *RSC advances*. – 2016. – Vol. 6, – № 86. – P. 83312–83320.
104. Darwish, T. A. Spiropyran–amidine: a molecular canary for visual detection of carbon dioxide gas / T. A. Darwish, R. A. Evans, M. James, T. L. Hanley // *Chemistry–A European Journal*. – 2011. – Vol. 17, – № 41. – P. 11399–11404.
105. Tian, W. An insight into the solvent effect on photo-, solvato-chromism of spiropyran through the perspective of intermolecular interactions / W. Tian, J. Tian // *Dyes and Pigments*. – 2014. – Vol. 105. – P. 66–74.
106. Avagliano, D. Spiropyran Meets Guanine Quadruplexes: Isomerization Mechanism and DNA Binding Modes of Quinolizidine-Substituted Spiropyran Probes / D. Avagliano, P. A. Sánchez-Murcia, L. González // *Chemistry–A European Journal*. – 2020. – Vol. 26, – № 57. – P. 13039–13045.
107. Andersson, J. Photoswitched DNA-binding of a photochromic spiropyran / J. Andersson, S. Li, P. Lincoln, J. Andréasson // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130, – № 36. – P. 11836–11837.
108. Brieke, C. Spiropyran photoswitches in the context of DNA: synthesis and photochromic properties / C. Brieke, A. Heckel // *Chemistry–A European Journal*. – 2013. – Vol. 19, – № 46. – P. 15726–15734.

109. Hammarson, M. DNA-Binding Properties of Amidine-Substituted Spiropyran Photoswitches / M. Hammarson, J. R. Nilsson, S. Li, P. Lincoln, J. Andréasson // *Chemistry—A European Journal*. – 2014. – Vol. 20, – № 48. – P. 15855–15862.
110. Movia, D. Determination of spiropyran cytotoxicity by high content screening and analysis for safe application in bionanosensing / D. Movia, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Giordani // *Chemical research in toxicology*. – 2010. – Vol. 23, – № 9. – P. 1459–1466.
111. Hao, G. Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy / G. Hao, Z. P. Xu, L. Li // *RSC advances*. – 2018. – Vol. 8, – № 39. – P. 22182–22192.
112. Lee, S. Effect of exogenous pH on cell growth of breast cancer cells / S. Lee, A. Shanti // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, – № 18. – P. 9910.
113. Kato, Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer / Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba // *Cancer cell international*. – 2013. – Vol. 13, – № 1. – P. 1–8.
114. Gerweck, L. E. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer / L. E. Gerweck, K. Seetharaman // *Cancer research*. – 1996. – Vol. 56, – № 6. – P. 1194–1198.
115. Asanuma, H. Spiropyran as a regulator of DNA hybridization with reversed switching mode to that of azobenzene / H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Yoshida, T. Takarada, X. Liang, M. Komiyama // *Chemistry Letters*. – 2001. – Vol. 30, – № 2. – P. 108–109.
116. Zhang, P. DNA modification with photochromic spiro compounds / P. Zhang, J. B. Meng, T. Matsuura, Y. M. Wang // *Chinese Chemical Letters*. – 2002. – Vol. 13, – № 4. – P. 299–302.

117. Beyer, C. Synthesis of DNA with spiropyrans as an internal covalent modification / C. Beyer, H. A. Wagenknecht // *Synlett.* – 2010. – Vol. 2010, – № 09. – P. 1371–1376.
118. Shao, N. Design of *bis*-spiropyran ligands as dipolar molecule receptors and application to in vivo glutathione fluorescent probes / N. Shao, J. Jin, H. Wang, J. Zheng, R. Yang, W. Chan, Z. Abliz // *Journal of the American Chemical Society.* – 2010. – Vol. 132, – № 2. – P. 725–736.
119. Hudson, V. M. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation / V. M. Hudson // *Free radical biology and medicine.* – 2001. – Vol. 30, – № 12. – P. 1440–1461.
120. Townsend, D. M. The importance of glutathione in human disease / D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero // *Biomedicine & pharmacotherapy.* – 2003. – Vol. 57, – № 3/4. – P. 145–155.
121. Ballatori, N. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, C. L. Hammond // *Walter de Gruyter*, 2009.
122. Matuz-Mares, D. Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases / D. Matuz-Mares, H. Riveros-Rosas, M. M. Vilchis-Landeros, H. Vázquez-Meza // *Antioxidants.* – 2021. – Vol. 10, – № 8. – P. 1220.
123. Son, S. Light-responsive micelles of spiropyran initiated hyperbranched polyglycerol for smart drug delivery / S. Son, E. Shin, B. S. Kim // *Biomacromolecules.* – 2014. – Vol. 15, – № 2. – P. 628–634.
124. Lazarenko, V. A. High-throughput small-molecule crystallography at the ‘Belok’ beamline of the Kurchatov synchrotron radiation source: Transition metal complexes with azomethine ligands as a case study / V. A. Lazarenko, P. V. Dorovatovskii, Y. V. Zubavichus, A. S. Burlov, Y. V. Koshchlenko, V. G. Vlasenko, V. N. Khrustalev // *Crystals.* – 2017. – Vol. 7, – № 11. – P. 325.

125. Svetogorov, R. D. Belok/XSA diffraction beamline for studying crystalline samples at Kurchatov Synchrotron Radiation Source / R. D. Svetogorov, P. V. Dorovatovskii, V. A. Lazarenko // *Crystal Research and Technology*. – 2020. – Vol. 55, – № 5. – P. 1900184(1–6).
126. Kabsch, W. xds / W. Kabsch // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2010. – Vol. 66, – № 2. – P. 125–132.
127. Dolomanov, O. V. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program / O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann // *Journal of applied crystallography*. – 2009. – Vol. 42, – № 2. – P. 339–341.
128. Sheldrick, G. M. A short history of SHELX / G. M. Sheldrick // *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*. – 2008. – Vol. 64, – № 1. – P. 112–122.
129. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL / G. M. Sheldrick // *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*. – 2015. – Vol. 71, – № 1. – P. 3–8.
130. Spek, A. L. Single-crystal structure validation with the program PLATON / A. L. Spek // *Journal of applied crystallography*. – 2003. – Vol. 36, – № 1. – P. 7–13.
131. Frisch, M. J. Gaussian 09 Revision A. 02, Gaussian Inc / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria // Wallingford CT. – 2009. – Vol. 66. – P. 219.
132. Becke, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories / A. D. Becke // *The Journal of chemical physics*. – 1993. – Vol. 98, – № 2. – P. 1372–1377.
133. Becke, A. D. A new inhomogeneity parameter in density-functional Theory / A. D. Becke // *The Journal of chemical physics*. – 1998. – Vol. 109, – № 6. – P.

- 2092–2098.
134. Lee, C. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / C. Lee, W. Yang, R. G. Parr // *Physical review B*. – 1988. – Vol. 37, – № 2. – P. 785.
 135. Bauernschmitt, R. Treatment of electronic excitations within the adiabatic approximation of time dependent density functional theory / R. Bauernschmitt, R. Ahlrichs // *Chemical Physics Letters*. – 1996. – Vol. 256, – № 4/5. – P. 454–464.
 136. Casida, M. E. Molecular excitation energies to high-lying bound states from timedependent density-functional response theory: Characterization and correction of the time-dependent local density approximation ionization threshold / M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R Salahub // *The Journal of chemical physics*. – 1998. – Vol. 108, – № 11. – P. 4439–4449.
 137. Stratmann, R. E. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules / R. E. Stratmann, G. E. Scuseria, M. J. Frisch // *The Journal of chemical physics*. – 1998. – Vol. 109, – № 19. – P. 8218–8224.
 138. Tomasi, J. Quantum mechanical continuum solvation models / J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi // *Chemical reviews*. – 2005. – Vol. 105, – № 8. – P. 2999–3094.
 139. Wynberg, H. The Reimer-Tiemann Reaction / H. Wynberg // *Chemical Reviews*. – 1960. – Vol. 60, – № 2. – P. 169–184.
 140. Liu, Y. Synthesis and biological activities of novel artemisinin derivatives as cysteine protease falcipain-2 inhibitors / Y. Liu, W. Q. Lu, K. Q. Cui, W. Luo, J. Wang, C. Guo // *Archives of pharmacal research*. – 2012. – Vol. 35, – № 9. – P. 1525–1531.
 141. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay / T. Mosmann // *J. Immunol*.

- Methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
142. Malacrida, A. Anti-multiple myeloma potential of secondary metabolites from hibiscus sabdariffa / A. Malacrida, V. Cavalloro, E. Martino, A. Cassetti, G. Nicolini, R. Rigolio, G. Cavaletti, B. Mannucci, F. Vasile, M. D. Giacomo, C. Simona, M. Mariarosaria // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, – № 13. – P. 2500.
143. Scudiero, D. A. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines / D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, M. R. Boyd // *Cancer research*. – 1988. – Vol. 48, – № 17. – P. 4827–4833.
144. Monks, A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines / A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff G. G. Marcia, C. Hugh, M. Joseph, B. Michael // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 1991. – Vol. 83, – № 11. – P. 757–766.
145. Shoemaker, R. H. Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery / R. H. Shoemaker, D. A. Scudiero, G. Melillo, M. J. Currens, A. P. Monks, A. A. Rabow, D. G. Covell, E. A. Sausville // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2002. – Vol. 2, – № 3. – P. 229–246.
146. Skehan, P. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening / P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 1990. – Vol. 82, – № 13. – P. 1107–1112.
147. Popiołkiewicz, J. *In vitro* toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs—genistein glycosides / J. Popiołkiewicz, K. Polkowski, J. S. Skierski, A. P. Mazurek // *Cancer Letters*. – 2005. – Vol. 229, – № 1. – P. 67–75.
148. Do, T. T. Improved Anticancer Activity of the Malloapelta B-Nanoliposomal

- Complex against Lung Carcinoma / T. T. Do, T. N. Nguyen, T. P. Do, T. C. Nguyen, H. P. Trieu, P. T. T. Vu, T. A. H. Le // Applied Sciences. – 2020. – Vol. 10, – № 22. – P. 8148.
149. Nguyen Tien, C. Synthesis, structure and *in vitro* cytotoxicity testing of some 1, 3, 4-oxadiazoline derivatives from 2-hydroxy-5-iodobenzoic acid / C. Nguyen Tien, T. Nguyen Van, G. Le Duc, M. Vu Quoc, T. Vu Quoc, T. Pham Chien, H. Nguyen Huy, A. Dang Thi Tuyet, L. Van Meervelt // Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. – 2018. – Vol. 74, – № 7. – P. 839–846.
150. Chen, Z. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs / Z. Chen, R. Bertin, G. Froidi // Food chemistry. – 2013. – Vol. 138, – № 1. – P. 414–420.
151. Kim, K. S. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea* / K. S. Kim, S. Lee, Y. S. Lee, S. H. Jung, Y. Park, K. H. Shin, B. K. Kim // Journal of ethnopharmacology. – 2003. – Vol. 85, – № 1. – P. 69–72.
152. Barhé, T. A. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals / T. A. Barhé, G. R. F. Tchouya // Arabian Journal of Chemistry. – 2016. – Vol. 9, – № 1. – P. 1–8.
153. Saeed, N. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L / N. Saeed, M. R. Khan, M. Shabbir // BMC complementary and alternative medicine. – 2012. – Vol. 12, – № 1. – P. 1–12.
154. Ácsová, A. Selected *in vitro* methods to determine antioxidant activity of hydrophilic/lipophilic substances / A. Ácsová, S. Martiniaková, J. Hojerová // Acta Chimica Slovaca. – 2019. – Vol. 12, – № 2. – P. 200–211.
155. Shahinuzzaman, M. *In vitro* antioxidant activity of *Ficus carica* L. latex from 18 different cultivars / M. Shahinuzzaman, Z. Yaakob, F. H. Anuar, P. Akhtar, N. H. A. Kadir, A. K. M. Hasan, K. Sobayel, M. Nour, H. Sindi, N. Amin // Scientific

- reports. – 2020. – Vol. 10, – № 1. – P. 1–14.
156. Sivakumar, K. K. Synthesis, *in-vitro* antimicrobial and antitubercular screening of Schiff bases of 3-amino-1-phenyl-4-[2-(4-phenyl-1,3-thiazol-2-yl) hydrazin-1-ylidene]-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one / K. K. Sivakumar, A. Rajasekaran // Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences. – 2013. – Vol. 5, – № 2. – P. 126.
157. Burits, M. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil / M. Burits, F. Bucar // Phytotherapy research. – 2000. – Vol. 14, – № 5. – P. 323–328.
158. Marxen, K. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements / K. Marxen, K. H. Vanselow, S. Lippemeier, R. Hintze, A. Ruser, U. P. Hansen // Sensors. – 2007. – Vol. 7, – № 10. – P. 2080–2095.
159. Holtje, H. D. Molecular modeling. T. 5 / H. D. Holtje, W. Sippl, D. Rognan, G. Folkers // Wiley-VCH Weinheim, Germany, 2003.
160. Narsinghani, T. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives / T. Narsinghani, M. C. Sharma, S. Bhargav // Medicinal Chemistry Research. – 2013. – Vol. 22. – P. 4059–4068.
161. Park, J. H. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain / J. H. Park, Y. Liu, M. A. Lemmon, R. Radhakrishnan // Biochemical Journal. – 2012. – Vol. 448, – P. 417.
162. Neumann, T. Evaluation of improved glycogen synthase kinase-3 α inhibitors in models of acute myeloid leukemia / T. Neumann, L. Benajiba, S. Göring, K. Stegmaier, B. Schmidt // Journal of medicinal chemistry. – 2015. – Vol. 58, – № 22. – P. 8907–8919.
163. Huang, M. *In silico* Antivirus Repurposing and its Modification to Organoselenium Compounds as SARS-CoV-2 Spike Inhibitors/ M. Huang, M. Saragih, U. S. F. Tambunan // Pakistan journal of biological sciences: PJBS. –

2023. – Vol. 26, – № 2. – P. 81–90.
164. Vilar, S. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery / S. Vilar, G. Cozza, S. Moro // *Current topics in medicinal chemistry*. –2008. – Vol. 8, – № 18. – P. 1555–1572.
165. Sheng, Y. Towards good correlation between fragment molecular orbital interaction energies and experimental IC₅₀ for ligand binding: A case study of p38 MAP kinase / Y. Sheng, H. Watanabe, K. Maruyama, C. Watanabe, Y. Okiyama, T. Honma, K. Fukuzawa, S. Tanaka // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 16. – P. 421–434.
166. Li, M. J. Development of efficient docking strategies and structure-activity relationship study of the c-Met type II inhibitors / M. J. Li, G. Z. Wu, Q. Kaas, T. Jiang, R. L. Yu // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2017. – Vol. 75. – P. 241–249.
167. Казачкова, В. И. О взаимосвязии изомерии спиропиран-мероцианин и металлокоординации в комплексах 3d-металлов функционализированного спиропирана 2-оксаинданого ряда / В. И. Казачкова, С. Т. Нгуен, А. О. Буланов, А. А. Цатурян, Л. Д. Чан, И. Н. Щербakov // *Журнала структурной химии*. – 2023. – Т. 64. – № 8. – С. 114649. [Kazachkova, V. I. Interrelation Between the Spiropyran-Merocyanine Isomerism and the Metal Coordination in 3d Metal Complexes of a Functionalized Spiropyran of the 2-Oxaindane Series / V. I. Kazachkova, S. T. Nguyen, A. O. Bulanov, A. A. Tsaturyan, L. D. Chan, I. N. Shcherbakov // *Journal of Structural Chemistry*. – 2023. – Vol. 64. – № 8. – P. 1492–1503].
168. Нгуен, С. Т. Синтез, физико-химические свойства и биологическая активность тиосемикарбазонов на основе 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'-Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида / С. Т. Нгуен, А. А.

- Зантман, А. О. Буланов, Ч. Т. Т. Нгуен, Л. Д. Чан, Х. Д. Ву, Б. Н. Зыюнг, И. Н. Щербаков // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2023. – Т. 91. – № 65. – С. 60 – 64.
169. Nguyen, X. T. Study of the Schiff Base to Enamine-Ketone Rearrangement upon Condensation of Formyl Functionalized 2-Oxaindane Series Spiropyran with Aliphatic Amines / X. T. Nguyen, A. O. Bulanov, V. V. Lukov, G. Borodkin, T. T. T. Nguyen, L. D. Tran, H. D. Vu, B. N. Duong, V. A. Lazarenko, I. N. Shcherbakov // Russian Journal of General Chemistry. – 2023. – Vol. 93. – № 1. – P. 215 – 226.
170. Нгуен, С. Т. Енаминокетоны – функциональные производные на основе 7-гидрокси-3',3'-диметил-3'Н-спиро[хромен-2,1'-изобензофуран]-8-карбальдегида и замещенных ароматических аминов. Физико-химическое исследование и биологическая активность / С. Т. Нгуен, А. А. Зантман, А. О. Буланов, Ч. Т. Т. Нгуен, Л. Д. Чан, Х. Д. Ву, Б. Н. Зыюнг, В. А. Лазаренко, И. Н. Щербаков // Журнал общей химии. – 2023. – Т. 93. – № 5. – С. 670 – 683. [Nguyen, X. T. Enaminoketones: Functional Derivatives Based on 7-Hydroxy-3',3'-dimethyl-3'H-spiro[chromen-2,1'-isobenzofuran]-8-carbaldehyde with Aromatic Amines. Physicochemical Studies and Biological Activity / X. T. Nguyen, A. A. Zantman, A. O. Bulanov, T. T. T. Nguyen, L. D. Tran, H. D. Vu, B. N. Duong, V. A. Lazarenko, I. N. Shcherbakov // Russian Journal of General Chemistry. – 2023. – Vol. 93. – № 5. – P. 1028–1039].
171. Щербатых, А. А. Spiropyranes на основе бензофуранового фрагмента как аналитические реагенты на низкомолекулярные аминотиолы / А. А. Щербатых, О. И. Аскалепова, А. О. Буланов, И. Н. Щербаков, С. Т. Нгуен // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78, – № 2. – С. 151–158. [Shcherbatykh, A. A. Benzofuran Spiropyranes as Analytical Reagents for Low-Molecular-Weight Aminothiols / A. A. Shcherbatykh, O. I. Askalepova, A. O.

- Bulanov, I. N. Shcherbakov, S. T. Nguyen // Journal of Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 78. – № 2. – P. 200–206].
172. Lipinski, C. A. *In vitro* models for selection of development candidates: experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // Adv Drug Deliv Rev. – 1997. – Vol. 23, – № 1. – P. 3–25.
173. Veber, D. F. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates / D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple // Journal of medicinal chemistry. – 2002. – Vol. 45, – № 12. – P. 2615–2623.
174. Craciun, D. ADME-Tox profiles of some food additives and pesticides / D. Craciun, D. Modra, A. Isvoran // AIP Publishing LLC, 2015.
175. Shimasaki, C. Biotechnology entrepreneurship: starting, managing, and leading biotech companies / C. Shimasaki // Academic Press, 2014.
176. McCarren, P. An investigation into pharmaceutically relevant mutagenicity data and the influence on Ames predictive potential / P. McCarren, C. Springer, L. Whitehead // Journal of cheminformatics. – 2011. – Vol. 3, – № 1. – P. 1–20.
177. Cutler, N. R. Critical pathways to success in CNS drug development / N. R. Cutler, J. J. Sramek, M. F. Murphy, H. Riordan, P. Biek, A. Carta // John Wiley & Sons, 2010.
178. Sanguinetti, M. C. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia / M. C. Sanguinetti, M. Tristani-Firouzi // Nature. – 2006. – Vol. 440, – № 7083. – P. 463–469.
179. Wang, J. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations / J. Wang, B. Wang, H. Chu, Y. Yao // OncoTargets and therapy. – 2016. – P. 3711–3726.

180. Walker, F. Growth factor receptor expression in anal squamous lesions: modifications associated with oncogenic human papillomavirus and human immunodeficiency virus / F. Walker, L. Abramowitz, D. Benabderrahmane, X. Duval // *Human pathology*. – 2009. – Vol. 40, – № 11. – P. 1517–1527.
181. Pathology, R. B. Robbins basic pathology / R. B. Pathology // Saunders Elsevier, 2013.
182. Huang, P. The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment / P. Huang, X. Xu, L. Wang, B. Zhu, X. Wang, J. Xia // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2014. – Vol. 18, – № 2. – P. 218–230.
183. Gohlke, H. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions / H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe // *Journal of molecular biology*. – 2000. – Vol. 295, – № 2. – P. 337–356.
184. Azevedo, W. F. de. Docking screens for drug discovery / W. F. de Azevedo // Springer, 2019.

Приложение

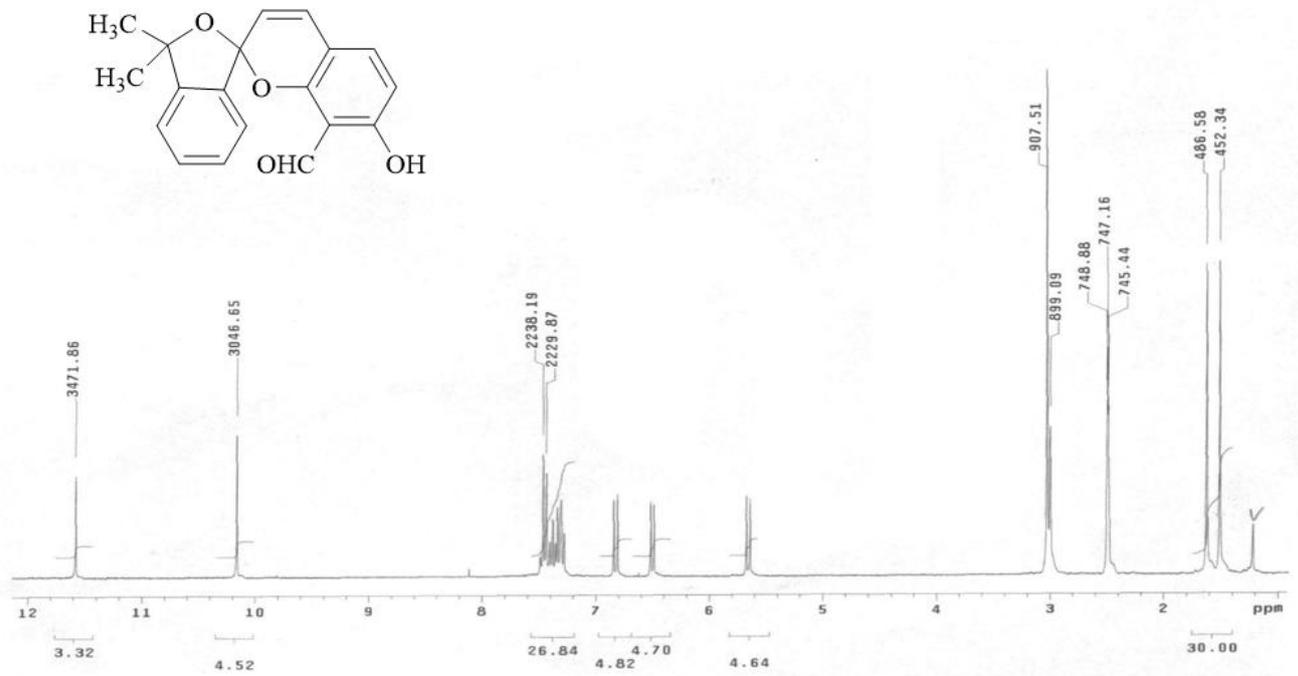
Рисунок S1. Спектр ^1H ЯМР спиропирана **P10** в $\text{DMSO-}d_6$.

Таблица S2. Характеристики основных сигналов (химический сдвиг, δ , м.д.; интенсивность, форма сигналов) в спектрах ^1H ЯМР тиосемикарбазонов **Tn(1–10)**.

Соед.	R	Расположение H: δ , м.д. (H, J Гц)						
		3'-CH ₃	OH	H ¹⁰	NH ^a	H ²	H ⁵	H ⁶
Tn1	CH(CH ₃) ₂	1.59 (3H, c)	10.29	8.42	11.40	6.55	6.84	5.70
		1.44 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.38)	(1H, д, 9.64)	(1H, д, 9.64)
Tn2	C(CH ₃) ₃	1.60 (3H, c)	10.57	8.35	11.33	6.57	6.85	5.70
		1.46 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.39)	(1H, д, 9.64)	(1H, д, 9.64)
Tn3	H	1.63 (3H, c)	9.99	8.47	11.53	6.57	6.86	5.71
		1.46 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.40)	(1H, д, 9.60)	(1H, д, 9.60)
Tn4	Ph	1.63 (3H, c)	10.34	8.56	11.87	6.58	6.87	5.72
		1.46 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.38)	(1H, д, 9.62)	(1H, д, 9.62)
Tn5	<i>n</i> -толил	1.64 (3H, c)	10.02	8.56	11.83	6.59	6.87	5.73
		1.47 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.42)	(1H, д, 9.67)	(1H, д, 9.67)
Tn6	2,4-диметилфенил	1.64 (3H, c)	10.02	8.56	11.76	6.58	6.87	5.72
		1.47 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.37)	(1H, д, 9.65)	(1H, д, 9.65)
Tn7	3,4-диметилфенил	1.66 (3H, c)	10.46	8.52	11.52	6.57	6.85	5.69
		1.50 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.39)	(1H, д, 9.62)	(1H, д, 9.61)
Tn8	CH ₂ Ph	1.60 (3H, c)	10.04	8.49	11.65	6.54	6.84	5.69
		1.44 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.39)	(1H, д, 9.66)	(1H, д, 9.66)
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	1.60 (3H, c)	10.10	8.27	11.55	6.56	6.84	5.70
		1.44 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.37)	(1H, д, 9.64)	(1H, д, 9.64)
Tn10	CH ₃ (CH)C ₃ H ₁₁	1.62 (3H, c)	10.32	8.44	11.40	6.58	6.86	5.71
		1.47 (3H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, c)	(1H, д, 8.37)	(1H, д, 9.69)	(1H, д, 9.69)

Таблица S3. Значение рассчитанной относительной стабильности (ккал/моль) изомерных форм тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** в газовой фазе и растворе ДМСО (B3LYP/6 311++G(d,p)).

Соед.	R	Sp-OH		Sp-NH		EZE-OH		EZZ-NH		ZEZ-NH	
		Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО
Tn1	CH(CH ₃) ₂	0.00	0.00	16.39	11.12	10.89	3.84	16.00	7.96	9.56	0.98
Tn2	C(CH ₃) ₃	0.00	0.00	10.89	8.75	11.23	3.24	12.63	4.18	9.17	0.38
Tn3	H	0.00	0.00	16.14	11.14	10.00	3.23	11.90	4.47	12.07	0.73
Tn4	Ph	0.00	0.68	11.20	9.94	10.63	4.34	12.32	5.60	6.01	0.00
Tn5	<i>n</i> -толил	0.00	0.94	11.00	10.10	12.93	6.06	12.18	5.57	5.70	0.00
Tn6	2,4-диметилфенил	0.00	1.15	17.06	12.36	10.65	4.84	12.14	5.85	5.18	0.00
Tn7	3,4-диметилфенил	0.00	1.06	11.00	10.23	10.78	3.71	12.30	9.52	5.54	0.00
Tn8	CH ₂ Ph	0.00	0.00	10.75	8.74	10.51	3.74	11.65	4.44	9.13	0.77
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	0.00	0.00	15.93	11.44	11.73	4.09	13.06	4.96	9.50	0.96
Tn10	CH ₃ (CH)C ₅ H ₁₁	0.00	0.00	10.82	8.59	13.77	5.25	16.24	8.14	8.89	0.40

Таблица S4. Рассчитанные в рамках приближения TD DFT (B3LYP/6-311G(d)) синглетные возбужденные состояния тиосемикарбазонов **Tn(1–10)** (изомеры Sp-OH) в растворе ДМСО.

Соед.	Изомер	N	λ (нм)	f	Основной состав
Tn8 R=CH ₂ Ph	ZEZ-NH	1	425	1.495	49% B3MO→HСМО
		2	390	0.040	20% B3MO-1→HСМО
		8	319	0.067	24% B3MO→HСМО+1 43% B3MO-1→HСМО+1
	Sp-OH	1	359	0.085	41% B3MO→HСМО
		2	334	0.852	41% B3MO-1→HСМО
		3	333	0.028	6.3% B3MO→HСМО
		5	279	0.453	46% B3MO-2→HСМО 46% B3MO→HСМО+1
	Tn1 R=CH(CH ₃) ₂	Sp-OH	1	359	0.091
2			336	0.250	31% B3MO-2→HСМО
3			334	0.612	15% B3MO-1→HСМО
4			334	0.612	26% B3MO-1→HСМО
5			279	0.450	46% B3MO→HСМО+1
Tn2 R= C(CH ₃) ₃	Sp-OH	1	359	0.104	38% B3MO→HСМО
		2	343	0.025	45% B3MO-2→HСМО
		3	337	0.820	37% B3MO-1→HСМО
		4	291	0.093	48% B3MO-3→HСМО
		5	279	0.444	46% B3MO→HСМО+1
Tn3 R=H	Sp-OH	1	363	0.083	42% B3MO→HСМО
		2	335	0.836	43% B3MO-1→HСМО
		3	331	0.020	47% B3MO-2→HСМО
		4	282	0.030	47% B3MO-3→HСМО
		5	278	0.427	45% B3MO→HСМО+1
Tn4 R=Ph	Sp-OH	1	370	0.116	44% B3MO→HСМО
		2	349	0.343	25% B3MO-3→HСМО
		3	346	0.652	17% B3MO→HСМО
		4	346	0.652	26% B3MO-1→HСМО
		5	323	0.125	46% B3MO-2→HСМО
Tn5 R= <i>n</i> -толил	Sp-OH	1	369	0.139	44% B3MO→HСМО
		2	352	0.707	42% B3MO-1→HСМО
		3	347	0.178	39% B3MO-3→HСМО
		4	331	0.231	45% B3MO-2→HСМО
		5	279	0.473	45% B3MO→HСМО+1
Tn6 R=2,4-диметилфенил	Sp-OH	1	367	0.109	43% B3MO→HСМО
		2	353	0.108	13% B3MO-3→HСМО
		3	342	0.910	33% B3MO-2→HСМО
		4	342	0.910	38% B3MO-1→HСМО
		5	279	0.440	46% B3MO→HСМО+1

Tn7 R=3,4-диметилфенил	Sp-OH	1	368	0.134	44% B3MO→HCMO
		2	353	0.265	17% B3MO-3→HCMO
		3	345	0.658	30% B3MO-1→HCMO
		5	279	0.463	19% B3MO-3→HCMO
Tn9 R=(CH ₂) ₂ Ph	Sp-OH	1	360	0.089	45% B3MO→HCMO+1
		2	335	0.848	40% B3MO→HCMO
		3	334	0.058	39% B3MO-1→HCMO
		5	279	0.440	6.2% B3MO→HCMO
Tn10 CH ₃ (CH)C ₅ H ₁₁	Sp-OH	1	359	0.090	44% B3MO-2→HCMO
		2	336	0.255	33% B3MO-1→HCMO
		3	334	0.596	13% B3MO-2→HCMO
		5	279	0.450	29% B3MO-2→HCMO
					46% B3MO→HCMO+1

N: номер возбужденного состояния; λ : длина волны, нм; f: сила осциллятора. В составе состояний приведены одноэлектронные переходы с вкладом более 5%.

Таблица S5. Химические сдвиги сигналов в ^1H ЯМР спектрах изомеров енаминокетонов **En(1–7)** в растворе ДМСО.

Соед.	R	Изомер	Протон									
			ОН	NH	H ⁹	H ⁷	H ^{8'}	H ⁵	H ⁸	H ⁴	H ^{5', H^{6'}, H^{7'}}	2CH ₃
En1	(CH ₂) ₂ OH	Глав.	5.02	11.63	8.23	8.00	7.99	7.82	6.77	5.99	7.43–7.66	1.64
		Мино.	5.02	11.34	7.28	7.98	7.99	7.78	6.76	5.98		1.64
		Δ	-	0.29	-0.05	0.02	-	0.04	0.01	0.01		-
En2	CH(CH ₃) ₂	Глав.	-	11.80	8.29	8.02	7.98	7.81	6.78	5.99	7.44–7.65	1.63
		Мино.	-	11.44	8.34	7.98	7.98	7.79	6.76	5.97		1.63
		Δ	-	0.36	-0.05	0.04	-	0.02	0.02	0.02		-
En3	C(CH ₃) ₃	Глав.	-	12.30	8.30	8.04	7.98	7.81	6.78	6.01	7.39–7.65	1.62
		Мино.	-	11.92	8.35	7.95	7.98	7.79	6.76	5.97		1.62
		Δ	-	0.38	-0.05	0.09	-	0.02	0.02	0.04		-
En4	<i>n</i> -толил	Глав.	-	13.62	8.67	8.10	8.02	7.92	6.84	6.08	7.48–7.70	1.66
		Мино.	-	13.24	8.68	8.10	8.02	7.92	6.83	6.09		1.66
		Δ	-	0.38	-0.01	-	-	-	0.01	-0.01		-
En5	3,4-диметилфенил	Глав.	-	13.63	8.66	8.06–8.19	7.97–8.06	7.97–8.06	6.85	6.08	7.39–7.72	1.63
		Мино.	-	13.26	8.69				6.82	6.07		1.63
		Δ	-	0.37	-0.03				0.03	0.01		-
En6	4-нитрофенил	Глав.	-	13.51	8.69	8.18–8.25	8.18–8.25	8.06	6.58	6.07	7.48–7.91	1.63
		Мино.	-	13.18	8.84			8.12	6.69	5.92		1.63
		Δ	-	0.33	-0.15			-0.06	-0.11	0.15		-
En7	2,3-дихлорфенил	Глав.	-	14.08	8.77	8.07–8.26	8.04	7.88–7.99	6.89	6.12	7.42–7.71	1.67
		Мино.	-	13.79	8.79		8.04		6.99	6.12		1.67
		Δ	-	0.29	-0.02		-		-0.10	-		-

Таблица S6. Значение рассчитанной относительной стабильности (ккал/моль) изомерных форм соединений **En(1–7)**.

Соед.	R	Sp-OH		Sp-NH		ZZE-OH		ZZZ-NH		ZEE-NH		ZEZ-NH	
		Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО	Газ	ДМСО
En1	(CH ₂) ₂ OH	4.72	10.65	8.22	9.40	0.00	0.47	0.06	0.50	0.70	0.26	0.57	0.00
En2	CH(CH ₃) ₂	5.37	11.10	7.81	9.43	0.00	0.71	0.39	0.47	0.80	0.25	0.66	0.00
En3	C(CH ₃) ₃	5.85	11.31	7.50	8.95	0.00	0.70	0.28	0.48	0.78	0.33	0.61	0.00
En4	<i>n</i> -толил	4.93	9.70	7.74	9.74	0.00	0.32	0.44	0.51	0.95	0.32	0.83	0.00
En5	3,4-диметилфенил	5.08	9.80	7.66	9.67	0.00	0.68	0.49	0.50	0.94	0.30	0.88	0.00
En6	4-нитрофенил	4.99	9.33	8.61	10.38	0.00	0.47	2.90	2.67	1.00	0.24	0.98	0.00
En7	2,3-дихлорфенил	4.14	8.32	10.47	12.67	0.03	0.62	0.00	0.36	0.87	0.27	0.61	0.00

Таблица S7. Рассчитанное TD DFT (B3LYP/6-311G(d)) синглетные возбужденные состояния **En(1–3,7)** (изомеры *ZEZ-NH* и *ZEE-NH*) в растворе ДМСО.

Соед.	Изомер	N	λ (нм)	f	Основной состав
En1 R=(CH ₂) ₂ OH	<i>ZEZ-NH</i>	1	424	1.410	48% ВЗМО→НСМО
		2	398	0.110	42% ВЗМО-1→НСМО
		4	358	0.037	44% ВЗМО→НСМО+1
		9	292	0.202	36% ВЗМО-1→НСМО+1
	<i>ZEE-NH</i>	1	437	0.980	42% ВЗМО→НСМО
		2	394	0.590	40% ВЗМО-1→НСМО
		4	360	0.010	45% ВЗМО→НСМО+1
		8	295	0.203	38% ВЗМО-1→НСМО+1
	Sp-OH	1	337	0.072	45% ВЗМО→НСМО
		2	280	0.260	45% ВЗМО→НСМО+1
		3	273	0.420	45% ВЗМО-1→НСМО
	En2 R=CH(CH ₃) ₂	<i>ZEZ-NH</i>	1	424	1.370
2			401	0.168	44% ВЗМО-1→НСМО
4			351	0.030	45% ВЗМО→НСМО+1
9			291	0.255	41% ВЗМО-1→НСМО+1
<i>ZEE-NH</i>		1	437	0.930	41% ВЗМО→НСМО
		2	396	0.650	40% ВЗМО-1→НСМО
		4	352	0.010	46% ВЗМО→НСМО+1
		8	294	0.240	41% ВЗМО-1→НСМО+1
En3 R=C(CH ₃) ₃	<i>ZEZ-NH</i>	1	424	1.395	47% ВЗМО→НСМО
		2	400	0.156	43% ВЗМО-1→НСМО
		4	355	0.030	45% ВЗМО→НСМО+1
		8	294	0.128	20% ВЗМО-1→НСМО+1
	<i>ZEE-NH</i>	1	436	0.960	41% ВЗМО→НСМО
		2	396	0.630	40% ВЗМО-1→НСМО
		4	356	0.010	46% ВЗМО→НСМО+1
		8	295	0.210	37% ВЗМО-1→НСМО+1
En7 R=2,3-дихлор- фенил	<i>ZEZ-NH</i>	1	434	1.340	39% ВЗМО→НСМО
		2	423	0.350	34% ВЗМО→НСМО+1
		3	391	0.058	42% ВЗМО-1→НСМО
		6	342	0.496	46% ВЗМО-1→НСМО+1
		14	276	0.054	27% ВЗМО→НСМО+4
	<i>ZEE-NH</i>	1	439	1.106	34% ВЗМО→НСМО
		2	424	0.380	34% ВЗМО→НСМО+1
		3	395	0.337	41% ВЗМО-1→НСМО
		6	345	0.499	46% ВЗМО-1→НСМО+1
		14	276	0.050	19% ВЗМО→НСМО+4

N: номер возбужденного состояния; λ : длина волны, нм; f: сила осциллятора. В составе состояний приведены одноэлектронные переходы с вкладом более 5%.

Таблица S8. Длина связи и валентные углы (ω) енаминокетона **En1** ($R=(CH_2)_2OH$) по данным PCA.

Связь	Длина связи (\AA)	Связь	Длина связи (\AA)
C ⁸ C ¹⁰	1.369(3)	C ⁵ C ⁶	1.461(3)
C ⁸ C ⁹	1.480(3)	C ⁷ C ⁶	1.348(3)
C ¹¹ C ¹⁰	1.414(3)	C ⁷ C ⁸	1.439(3)
C ¹¹ C ¹²	1.355(3)	C ³ C ⁴	1.402(3)
C ⁴ C ⁹	1.441(3)	O ³ C ⁵	1.257(3)
C ⁴ C ⁵	1.443(3)	O ² C ⁹	1.258(3)
Угол	ω ($^\circ$)	Угол	ω ($^\circ$)
C ¹² C ¹¹ C ¹⁰	123.2(2)	O ² C ⁹ C ⁸	120.60(19)
C ⁸ C ¹⁰ C ¹¹	127.9(2)	O ² C ⁹ C ⁴	121.9(2)
C ¹⁰ C ⁸ C ⁹	118.5(2)	O ³ C ⁵ C ⁴	122.6(2)
C ¹⁰ C ⁸ C ⁷	123.3(2)	O ³ C ⁵ C ⁶	120.2(2)

Таблица S9. Кристаллографические данные енаминокетона **En1** ($R=(CH_2)_2OH$).

Эмпирическая формула	C ₂₁ H ₂₁ NO ₄
Мол. вес, г/моль	351.39
Размеры кристалла, mm	0.30×0.20×0.10
Цвет кристалла	Желтый
Температура, К	100(2)
Объем ячейки(V), \AA^3	3508.0(17)
Выч. плотность(ρ), g/cm ³	1.331
F(000)	1488
μ (MoK α), mm ⁻¹	0.119
Кристаллографическая система	Триклинная
Пространственная группа	P-1
Z	8
Элементарная ячейка	a = 13.800 \AA b = 17.880 \AA c = 18.058 \AA α = 119.09 $^\circ$ β = 112.28 $^\circ$ γ = 90.01 $^\circ$
Диапазон индексов	-16 < h < 16 -21 < k < 21 -21 < l < 21
Число отражений; R _{int}	12347; 0.072
R индексы (все данные)	R ₁ = 0.0720 wR ₂ = 0.1355

Таблица S10. Спектральные свойства комплексов тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En** с ионами металлов в ацетонитриле (293 К).

Соед.	Ион	λ_{max} , нм	$\Delta\lambda_{max}$, нм	Соед.	Ион	λ_{max} , нм	$\Delta\lambda_{max}$, нм
Tn1 R=CH(CH ₃) ₂	-	328	-	Tn9 R=(CH ₂) ₂ Ph	-	330	-
	Cu ²⁺	538	210		Cu ²⁺	546	216
	Ni ²⁺	550	222		Ni ²⁺	538	208
	Co ²⁺	450	122		Co ²⁺	473	143
Tn2 R=C(CH ₃) ₃	-	332	-	Tn10 CH ₃ (CH)C ₅ H ₁₁	-	332	-
	Cu ²⁺	538	206		Cu ²⁺	494	162
	Ni ²⁺	559	227		Ni ²⁺	553	221
	Co ²⁺	444	112		Co ²⁺	437	105
Tn3 R=H	-	333	-	En1 R=(CH ₂) ₂ OH	-	429	-
	Cu ²⁺	540	207		Cu ²⁺	538	109
	Ni ²⁺	550	217		Ni ²⁺	427	-
	Co ²⁺	440	107		Co ²⁺	427	-
Tn4 R=Ph	-	331	-	En2 R=CH(CH ₃) ₂	-	429	-
	Cu ²⁺	549	218		Cu ²⁺	565	136
	Ni ²⁺	556	225		Ni ²⁺	427	-
	Co ²⁺	456	125		Co ²⁺	427	-
Tn5 R= <i>n</i> -толил	-	331	-	En3 R=C(CH ₃) ₃	-	429	-
	Cu ²⁺	545	214		Cu ²⁺	564	135
	Ni ²⁺	550	219		Ni ²⁺	427	-
	Co ²⁺	456	125		Co ²⁺	427	-
Tn6 R=2,4-диметил- фенил	-	331	-	En4 R= <i>n</i> -толил	-	434	-
	Cu ²⁺	549	218		Cu ²⁺	596	162
	Ni ²⁺	550	119		Ni ²⁺	445	-
	Co ²⁺	456	125		Co ²⁺	445	-
Tn7 R=3,4-диметил- фенил	-	330	-	En7 R=2,3-дихлор- фенил	-	443	-
	Cu ²⁺	544	214		Cu ²⁺	594	151
	Ni ²⁺	544	214		Ni ²⁺	445	-
	Co ²⁺	473	143		Co ²⁺	445	-

Таблица S11. Прогнозируемые ADMET-свойства тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En**.

Соед.	R	M ^[a]	TPSA ^[b]	b-rotN ^[c]	a-acc ^[d]	a-don ^[e]	logP ^[f]	L.V ^[g]	V.V ^[h]	HIA ^[i]
Tn1	CH(CH ₃) ₂	423.53	107.20	5	4	3	3.77	+	+	94.29
Tn2	C(CH ₃) ₃	437.55	107.20	5	4	3	3.98	+	+	94.49
Tn3	H	381.45	121.19	3	4	3	2.85	+	+	93.57
Tn4	Ph	457.54	107.20	5	4	3	4.33	+	+	95.43
Tn5	<i>n</i> -толил	471.57	107.20	5	4	3	4.67	+	+	95.56
Tn6	2,4-диметилфенил	485.60	107.20	5	4	3	4.96	+	+	95.69
Tn7	3,4-диметилфенил	485.60	107.20	5	4	3	4.96	+	+	95.69
Tn8	CH ₂ Ph	471.57	107.20	6	4	3	4.30	+	+	95.62
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	485.60	107.20	7	4	3	4.57	+	+	95.75
Tn10	CH ₃ (CH)C ₅ H ₁₁	479.63	107.20	9	4	3	5.09	+	+	95.06
En1	(CH ₂) ₂ OH	351.40	75.63	4	4	2	2.64	+	+	94.27
En2	CH(CH ₃) ₂	349.42	55.40	3	3	1	3.69	+	+	96.08
En3	C(CH ₃) ₃	363.45	55.40	3	3	1	3.94	+	+	96.16
En4	<i>n</i> -толил	397.47	55.40	3	3	1	4.39	+	+	96.70
En5	3,4-диметилфенил	411.49	55.40	3	3	1	4.80	+	+	96.78
En6	4-нитрофенил	428.44	101.22	4	5	1	3.42	+	+	90.10
En7	2,3-дихлорфенил	452.33	55.40	3	3	1	5.20	+	+	97.20

^[a]Молекулярная масса, г/моль; ^[b]Площадь топологической полярной поверхности, Å;

^[c]Количество вращающихся связей; ^[d]Количество акцепторов водородной связи;

^[e]Количество доноров водородной связи; ^[f]Логарифм коэффициента распределения соединения между *n*-октанолом и водой;

^[g]Соответствие правилу Липинского; ^[h]Соответствие правилу Вебера;

^[i]Всасывание в кишечнике человека, % (0–20%: плохое, 20–70%: умеренное, 70–100%: хорошее).

Таблица S12. Результат прогнозирования токсичности тиосемикарбазонов **Tn** и енаминокетонов **En**.

Соед.	R	Тест Эймса	СТМ ^[a]	СТР ^[b]	i-hERG ^[c]
Tn1	CH(CH ₃) ₂	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	средний риск
Tn2	C(CH ₃) ₃	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	средний риск
Tn3	H	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	высокий риск
Tn4	Ph	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	неопределенный
Tn5	<i>n</i> -толил	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	средний риск
Tn6	2,4-диметилфенил	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	средний риск
Tn7	3,4-диметилфенил	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	средний риск
Tn8	CH ₂ Ph	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	неопределенный
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	неопределенный
Tn10	CH ₃ (CH)C ₅ H ₁₁	немутагенный	Отрицательный	Отрицательный	средний риск
En1	(CH ₂) ₂ OH	немутагенный	Положительный	Положительный	средний риск
En2	CH(CH ₃) ₂	немутагенный	Положительный	Положительный	средний риск
En3	C(CH ₃) ₃	немутагенный	Положительный	Положительный	средний риск
En4	<i>n</i> -толил	немутагенный	Положительный	Положительный	средний риск
En5	3,4-диметилфенил	немутагенный	Отрицательный	Положительный	средний риск
En6	4-нитрофенил	немутагенный	Положительный	Положительный	высокий риск
En7	2,3-дихлорфенил	немутагенный	Положительный	Отрицательный	средний риск

^[a]Канцерогенный тест (мышь); ^[b]Канцерогенный тест (крыса); ^[c]Ингибирование hERG.

Таблица S13. Молекулярный докинг-анализ стыковки белка-мишени EGFR с тиосемикарбазонами **Tn** и енаминокетонами **En** в сравнении с эрлотинибом.

Соед.	R	S ^[a]	RMSD ^[b]	Водородные связи	<i>l</i> ^[c] , (Å)	C–H···π связи	<i>l</i> , (Å)
Tn1	CH(CH ₃) ₂	-9.88	1.42	Asp831,Thr766	2.86, 3.81	-	-
Tn2	C(CH ₃) ₃	-10.45	1.55	Asp831, Cys773	2.94, 3.99	Arg871	3.90
Tn3	H	-8.13	1.43	Asp831, Asp831	3.00, 3.04	Val702	4.34
Tn4	Ph	-9.78	1.56	Asn818, Asp831, Arg817	3.37, 3.29, 3.66	Val702	4.25
Tn5	<i>n</i> -толил	-10.26	1.71	Thr830, Lys721	2.90, 3.64	-	-
Tn6	2,4-диметилфенил	-9.22	1.52	Gly772	3.42	Gly772	3.67
Tn7	3,4-диметилфенил	-8.97	1.02	Arg817	3.05	Lys721	3.54
Tn8	CH ₂ Ph	-10.07	1.84	Asn818, Asp831	3.19, 2.94	-	-
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	-9.24	1.98	Asp831	3.64	Val702	4.15
Tn10	CH ₃ (CH)C ₅ H ₁₁	-8.41	1.56	Thr830, Lys721	2.82, 3.91	-	-
En1	(CH ₂) ₂ OH	-8.36	1.37	Met742, Lys721	3.71, 3.30	Arg817	4.19
En2	CH(CH ₃) ₂	-8.32	0.60	Cys773, Met769	3.85, 3.14	-	-
En3	C(CH ₃) ₃	-7.97	0.95	Thr766	2.81	-	-
En4	<i>n</i> -толил	-8.49	1.36	Met769	2.98	Arg817	4.21
En5	3,4-диметилфенил	-8.65	1.57	Met769	2.99	Arg817	4.20
En6	4-нитрофенил	-8.51	1.26	Lys721	3.34	Arg817	3.79
En7	2,3-дихлорфенил	-8.62	1.53	Met769	2.97	Arg817	4.23
Эрлотиниб		-11.86	1.13	Met769, Cys773	1.96, 2.00	Leu694	3.23

^[a]Энергия связи, ккал/моль; ^[b]Среднее квадратичное отклонение; ^[c]Длина связи, Å.

Таблица S14. Вычисленные значения энергия связи тиосемикарбазонов с EGFR (S , ккал/моль), экспериментальные значения IC_{50} , $pIC_{50} = -\lg(IC_{50})$ для тиосемикарбазонов по отношению к клеточной линии рака KB и MCF-7.

Соед.	R	IC_{50} , μM		pIC_{50}		S, ккал/моль
		KB	MCF-7	KB	MCF-7	
Tn1	CH(CH ₃) ₂	2.43	16.00	-0.39	-1.20	-9.88
Tn2	C(CH ₃) ₃	1.43	10.57	-0.16	-1.02	-10.45
Tn3	H	20.00	28.47	-1.30	-1.45	-8.13
Tn5	<i>n</i> -толил	1.92	20.17	-0.28	-1.30	-10.26
Tn6	2,4-диметилфенил	1.77	18.96	-0.25	-1.28	-9.22
Tn8	CH ₂ Ph	3.45	8.00	-0.54	-0.90	-10.07
Tn9	(CH ₂) ₂ Ph	3.44	14.86	-0.54	-1.17	-9.24