

ХИМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ И ТЕХНОЛОГИЙ  
Минск 2008



О. И. Шадыро, Г. А. Ксендзова,  
Г. И. Полозов, В. Л. Сорокин

---

## СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОФЕНОЛОВ

Способность вирусов приобретать устойчивость к действию лекарственных препаратов во многом определяет необходимость разработки новых эффективных противовирусных агентов с оригинальным механизмом действия. Современные методы создания новых противовирусных препаратов базируются на информации о взаимодействии вируса с клеткой и о закономерностях протекания биохимических процессов, лежащих в основе их жизнедеятельности. Основным свойством ряда наиболее эффективных ингибиторов вирусов является возможность участия в реализации последовательных превращений в инфицированной клетке, ведущих к встраиванию образующихся аномальных нуклеотидов в растущую цепь вирусной нуклеиновой кислоты [1]. Однако эти препараты обладают наряду с вирусингибирующими свойствами токсическими эффектами вследствие возможного воздействия на генетический аппарат «клетки-хозяина». В связи с этим привлекательным является поиск веществ, способных ингибировать размножение вирусов на стадиях, не связанных с процессами кодирования и реализации генетической информации. Такими свойствами могут обладать соединения, способные регулировать вероятность и направленность протекания свободнорадикальных процессов в биосистемах.

Работы в области свободнорадикальной вирусологии начаты недавно, однако уже показано, что продуцирование активных форм кислорода (АФК) и активация перекисного окисления липидов сопровождают течение различных вирусных инфекций, в том числе рино-, ВИЧ-, цитомегалоинфекций, гриппозной и различных нейровирусных инфекций, хронических вирусных гепатитов [2]. Поэтому исследование возможности использования антиоксидантов для профилактики и лечения вирусных заболеваний является заслуживающим внимания направлением в фармакологии. Тем не менее имеющиеся к настоящему времени сведения не позволяют установить связь между влиянием веществ на свободнорадикальные процессы и их противовирусной активностью. Сложность установления таких зависимостей обусловлена неоднозначной ролью свободнорадикаль-

ных процессов в развитии вирусной патологии. Это обусловлено тем, что реакции с участием АФК протекают, как правило, неселективно и их реализация может приводить к повреждению как «клетки-хозяина», так и вирусов. Поэтому остается открытым вопрос, какие вещества при введении в биосистемы могут изменять направленность протекания свободнорадикальных реакций так, чтобы обеспечить преимущественное формирование антивирусного эффекта. Поиску таких веществ и изучению их свойств посвящено настоящее исследование.

В свое время нами на основе пространственно замещенного о-аминофенола был разработан антивирусный препарат «Бутаминофен», эффективный при лечении герпетических поражений различного типа [3, 4]. Известно, что многие производные аминофенолов являются эффективными антиоксидантами [5, 6] и способны изменять направленность протекания различных свободнорадикальных процессов [7, 8]. Мы провели работу по синтезу ряда производных о-аминофенолов, изучению их антивирусной активности и реакционной способности по отношению к различным радикалам с целью поиска новых антивирусных средств и установления корреляции между их строением, антивирусными и антирадикальными свойствами.

### СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-2-АМИНОФЕНОЛА

Для решения поставленных задач был синтезирован ряд производных ди-трет-бутилированного о-аминофенола 1. Общие схемы синтеза представлены на рис. 1.

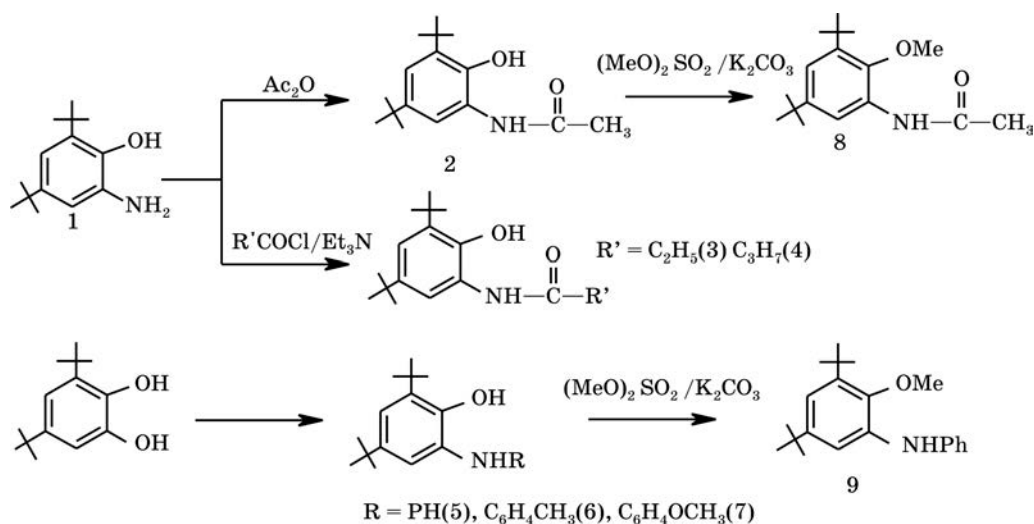


Рис. 1. Синтез производных 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола

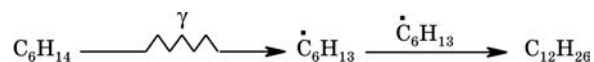
4,6-Ди-трет-бутил-2-аминофенол 1 был синтезирован по известной методике [9]. N-арилпроизводные 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола были синтезированы посредством обработки 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина анилином 5 и его производными 6, 7 в инертных растворителях (гексане, толуоле) в присутствии триэтиламина в качестве катализатора (см. рис. 1). 4,6-Ди-трет-бутил-2-[(N-ацетил)амино]фенол 2 был получен нагреванием 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола с уксусным ангидридом. Синтез N-ацилпроизводных 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола 3, 4 был осуществлен взаимодействием 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола с хлорангидридами карбоновых кислот в присутствии триэтиламина в качестве акцептора выделяющегося хлороводорода. O-метилированные производные 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола 8 и 9 были получены реакцией метилирования соединений 2 и 5 с использованием диметилсульфата.

Структуры всех синтезированных производных подтверждены методами  $^1\text{H}$  ЯМР и масс-спектроскопии.

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ

Исследовали способность синтезированных соединений взаимодействовать с органическими радикалами, изменяя тем самым вероятность протекания свободнорадикальных процессов с участием алкильных ( $\text{R}^\bullet$ ), пероксильных ( $\text{ROO}^\bullet$ ) и  $\alpha$ -гидроксиалкильных ( $\text{R}^\bullet\text{CHOH}$ ) радикалов. Такого типа радикальные интермедиаты возникают при индуцированных АФК процессах окисления и фрагментации компонентов клеточных мембран [10]. Для генерирования радикальных процессов использовали  $\gamma$ -излучение. В качестве модельных систем использовали вещества (гексан и этанол), радиолит которых хорошо изучен.

Известно, что при радиолитзе гексана образование додеканов различного строения происходит в основном в результате рекомбинации  $\bullet\text{C}_2$  и  $\bullet\text{C}_3$  гексильных радикалов [11]:



Следовательно, определяя суммарный выход додеканов ( $G(\text{C}_{12}\text{H}_{26})$ ) в присутствии добавок тестируемых соединений, можно оценить реакционную способность последних по отношению к алкильным радикалам.

При  $\gamma$ -облучении гексана в присутствии кислорода додеканы не образуются, так как кислород является эффективным акцептором алкильных радикалов, в результате чего возникают пероксильные ( $\text{ROO}^\bullet$ ) радикалы. Из последних, в свою очередь, в результате дальнейших превращений образуются соответствующие спирты и кетоны.

При радиоллизе гексана в присутствии  $O_2$  в качестве основных продуктов образуются гексанола и гексаноны [12]:

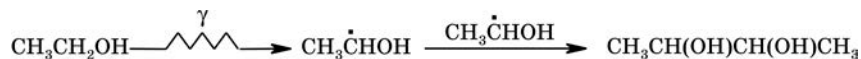


Суммарный выход гексанола и гексанонов ( $\Sigma G(ox)$ ) в присутствии аминифенолов зависит от эффективности их взаимодействия с радикалами  $C_6H_{13}OO\dot{O}$ .

В табл. 1 приведены суммарные выходы додеканов, образующихся при радиоллизе деаэрированного гексана за счет рекомбинации  $C_2$ - и  $C_3$ -радикалов гексана, а также суммарные выходы гексанола и гексанонов, образующихся при радиоллизе аэрированного гексана в присутствии веществ 1—9.

Изучение влияния добавок тестируемых соединений на радиоллиз этанола позволяет оценить их способность взаимодействовать с  $\alpha$ -гидроксиалкильными радикалами. Это представляется важным, поскольку радикалы данного типа образуются при действии АФК на гидроксилсодержащие биологически важные соединения, такие как углеводы, липиды, нуклеозиды, и их превращения приводят к фрагментации исходных объектов [13—19].

Радиоллиз этанола хорошо изучен [20], и установлено, что основным его продуктом является 2,3-бутандиол (2,3-БД), образование которого происходит за счет реакций рекомбинации  $\alpha$ -гидроксиалкильных радикалов:



Оценивая выход 2,3-бутандиола в присутствии различных соединений, можно сделать выводы об их реакционной способности по отношению к  $CH_3\dot{C}HON$ -радикалам. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние веществ 1—9 на выходы ( $G$ , мол./100 эВ) додеканов  $G(C_{12}H_{26})$ ,  
продуктов окисления гексана  $\Sigma G(ox)$  и 2,3-бутандиола  $G(2,3-БД)$

Исходные вещества, $C = 10^{-3}$ М	$G(C_{12}H_{26})$	$\Sigma G(ox)$	$G(2,3-БД)$
—	$0,48 \pm 0,03$	$2,04 \pm 0,11$	$1,29 \pm 0,04$
1	$0,09 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,11$	$0,10 \pm 0,01$
2	$0,27 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,09$	$0,72 \pm 0,04$
3	$0,27 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,09$	$0,85 \pm 0,06$
4	$0,32 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,08$	$0,76 \pm 0,05$
5	$0,11 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,09$	$0,28 \pm 0,01$
6	$0,09 \pm 0,01$	$1,70 \pm 0,13$	$0,31 \pm 0,01$
7	$0,08 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,02$
8	$0,46 \pm 0,02$	$2,02 \pm 0,14$	$1,28 \pm 0,05$
9	$0,44 \pm 0,02$	$1,99 \pm 0,09$	$1,26 \pm 0,07$

Из полученных данных (см. табл. 1) следует, что соединение 1 эффективнее других реагирует с частицами  $\text{CH}_3 \cdot \text{CNOH}$ , а вещества 8 и 9 практически не влияют на вероятность протекания процессов с участием алкильных, пероксильных и  $\alpha$ -гидроксиалкильных радикалов.

Реакционная способность производных аминифенолов по отношению к АФК была исследована на клеточной модели оксидантного взрыва, индуцируемого в перитонеальных макрофагах крыс частицами опсонизированного зимозана [21]. При оксидантном взрыве в фагоцитах происходит эффективная генерация АФК, обусловленная активацией НАДФН-оксидазного механизма продукции супероксид-анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ) [22]. Интенсивность генерации АФК оценивали методом люминолзависимой хемилюминесценции в отсутствие и в присутствии тестируемых веществ. Определяли эффективные ингибирующие концентрации исследуемых соединений, при которых происходит уменьшение свечения на 50 и 90 %, т. е.  $\text{EC}_{50}$  и  $\text{EC}_{90}$  (табл. 2).

Таблица 2

Эффективные концентрации аминифенолов, ингибирующие продукцию АФК макрофагами, стимулированными зимозаном

Вещество	Диапазон концентраций, $\mu\text{M}$	$\text{EC}_{50}$ , $\mu\text{M}$	$\text{EC}_{90}$ , $\mu\text{M}$
1	0,001—10	0,06	0,65
2	0,001—10	Не ингибирует	
3	0,001—10	Не ингибирует	
4	0,001—10	Не ингибирует	
5	0,001—10	9,8	>10
6	0,001—10	Не ингибирует	
9	0,001—10	Не ингибирует	

Из полученных данных следует, что соединение 1 в сотни и тысячи раз активнее других производных аминифенолов взаимодействует с АФК. В исследуемых диапазонах концентраций соединения 2, 3, 4, 6, 9 не влияли на интенсивность хемилюминесценции, а соединение 5 незначительно ее уменьшало, что указывает на их низкую реакционную способность по отношению к АФК. Аналогичные результаты были получены нами при оценке реакционной способности производных аминифенолов по отношению к АФК, которые генерировали, используя ферментативные системы [23, 24].

## АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОФЕНОЛОВ

Противовирусные свойства синтезированных веществ определяли в экспериментах на культуре клеток с вирусом герпеса простого I типа (ВГП-I). Исследования выполняли методом оценки цитопатического эффекта вируса на культуре клеток рабдомиосаркомы человека с ВГП-1. Критерием противови-

русного действия считали снижение титра вируса в присутствии тестируемых соединений в сравнении с контролем. На основе полученных данных вычисляли концентрации веществ, подавляющие репродукцию вируса на 50 и 90 % ( $EC_{50}$  и  $EC_{90}$  соответственно), а также максимально переносимые концентрации (МПК) тестируемых соединений (табл. 3).

Таблица 3

Противовирусные свойства и токсичность производных  
4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола

Тестируемые вещества	МПК, $\mu\text{M}$	$EC_{50}$ ( $I_{95}$ )*, $\mu\text{M}$	$EC_{90}$ ( $I_{95}$ ), $\mu\text{M}$
1	113,2	87,3 (214,9 $\div$ 35,3)	288,2 (709,9 $\div$ 117,2)
2	397,7	8,5 (10,5 $\div$ 6,9)	14,8 (18,2 $\div$ 12,1)
3	720,9	38,2 (41,3 $\div$ 35,3)	64,5 (69,6 $\div$ 59,5)
4	686,2	8,6 (10,3 $\div$ 7,2)	14,1 (17,2 $\div$ 11,7)
5	336,7	23,0 (56,4 $\div$ 9,4)	169,4 (316,2 $\div$ 90,9)
6	643,1	30,9 (37,0 $\div$ 25,7)	83,0 (99,4 $\div$ 69,1)
7	611,6	18,0 (22,4 $\div$ 14,5)	41,9 (52,3 $\div$ 33,6)
8	1444,0	798,0 (1053,8 $\div$ 604,3)	1960,5 (2588,8 $\div$ 1484,8)
9	722,0	255,2 (569,2 $\div$ 114,4)	623,8 (1373,9 $\div$ 283,3)

\*  $I_{95}$  — доверительный интервал при 95 % вероятности.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что производные аминофенолов обладают антивирусными свойствами, степень выраженности которых зависит от их строения. В большей степени они проявляются для производных аминофенолов, у которых в аминогруппе один атом водорода замещен на ацильную (соединения 2, 3, 4) или арильную (соединения 5, 6, 7) группы. Наличие свободных амино- и гидроксильной групп (соединение 1), равно как и замена атома водорода в гидроксиле на метильную группу (соединения 8 и 9), приводит к потере антивирусной активности у аминофенолов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в экспериментах на клеточных культурах было показано, что антиоксиданты подавляют размножение различных типов вирусов, включая вирус герпеса простого I типа. Однако использование в качестве антиоксидантов фенолов растительного происхождения или тиолов не позволяет ответить на вопрос, обусловлено ли их противовирусное действие антиокислительными свойствами либо реализацией других механизмов [2].

Известно, что многие производные аминофенолов относятся к эффективным антиоксидантам. Благодаря наличию атомов водорода в амино- и гидроксильной группах они являются восстановителями кислородцентрированных

радикалов, ингибируя тем самым процессы окисления биологически важных веществ и в первую очередь перекисное окисление липидов [5, 6]. В наших работах [7, 8] показано, что производные аминифенолов способны взаимодействовать с различными углеродцентрированными радикалами. Это делает их способными защищать биологически важные соединения от свободнорадикальных процессов фрагментации, которые протекают через стадии образования и последующего распада  $\alpha$ -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов липидов, пептидов и углеводов [12—18]. Обладая универсальными антирадикальными свойствами, липофильные производные аминифенолов могут эффективно защищать биомембраны от свободнорадикальных повреждений.

Как следует из данных, полученных на химических моделях (см. табл. 1), соединения 1—7 с той или иной степенью вероятности ингибируют реакции, протекающие с участием органических радикалов, таких как алкильные, пероксильные и  $\alpha$ -гидроксиалкильные. Об этом можно судить по радиационно-химическим выходам додеканов  $G(C_{12}H_{26})$ , продуктов окисления гексана  $\Sigma G(ox)$  и продуктов рекомбинации частиц  $CH_3\cdot CH_2\cdot$  — 2,3-бутандиола  $G(2,3-БД)$ . Это позволяет предположить, что данные соединения могут быть ингибиторами свободнорадикальных процессов окисления и фрагментации биологически важных веществ.

Осуществляя синтез веществ 8 и 9, мы полагали, что замена атома водорода в гидроксильной группе аминифенолов должна привести к утрате их способности взаимодействовать с органическими радикалами. Действительно, как следует из полученных данных (см. табл. 1), соединения 8 и 9 практически не влияли на выходы продуктов, к образованию которых приводят реакции, протекающие через стадию образования алкильных, пероксильных либо  $\alpha$ -гидроксиалкильных радикалов. Утрата этих свойств может быть причиной того, что данные соединения не обладают способностью блокировать АФК-индуцированные процессы повреждения биомолекул, поэтому они не способны защищать мембраны клеток и, как следствие, не обладают антивирусной активностью.

Оценивая взаимосвязь между реакционной способностью тестируемых веществ по отношению к АФК и их антивирусными свойствами, мы исходили из следующих экспериментально обнаруженных фактов. Соединение 1 эффективно взаимодействовало как с АФК, так и с органическими радикалами и при этом обладало низкой антивирусной активностью. Соединения 2—7, как и вещества 8 и 9, были малоактивны по отношению к АФК, но, в отличие от последних, реакционноспособны по отношению к органическим радикалам и проявили выраженные антивирусные свойства. Следовательно, полученные данные указывают на то, что производные аминифенолов, которые эффективно взаимодействуют с органическими радикалами и индифферентны к АФК, проявляют наибольшую активность в ингибировании размножения ВПГ-1.



Исходя из изложенного выше, можно заключить, что поиск антивирусных средств среди соединений, регулирующих свободнорадикальные процессы различного типа, целесообразно проводить среди веществ, которые способны защищать «клетку-хозяина» от свободнорадикального повреждения. При этом они не должны взаимодействовать с инициаторами этих процессов, такими как активные формы кислорода, давая последним возможность атаковать вирусы либо блокировать процессы их репликации.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Методы синтеза производных аминофенолов

**4,6-Ди-трет-бутил-2-[(N-ацетил)амино]фенол (2).** К 10,83 г (0,1061 моль) уксусного ангидрида при перемешивании добавляли порциями 1,00 г (45,2 ммоль) 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола. Реакционную смесь перемешивали при 40 °С в течение 15 мин и выливали в 100 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получали 0,77 г (96 %) 4,6-ди-трет-бутил-2-[(N-ацетил)амино]фенола, т. пл. 147—148 °С. ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, 100 МГц), δ, м. д.: 8,36 с (1H, OH), 7,75 уш с (1H, NH), 7,20 д (1H, CH; J = 2,8), 6,76 д (1H, CH; J = 2,8), 2,17 с (3H, CH<sub>3</sub>), 1,42 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,24 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*, (*I*<sub>отн</sub>): 263 (M<sup>+</sup>, 16).

**4,6-Ди-трет-бутил-2-[(N-пропаноил)амино]фенол (3).** К охлажденной до 0 °С смеси 0,40 г (18,1 ммоль) 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола и 0,26 г (25,3 ммоль) триэтиламина в 10 мл ТГФ добавляли по каплям 0,23 г (25,3 ммоль) пропаноилхлорида в 10 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 20 мин, отфильтровывали гидрохлорид триэтиламина, фильтрат упаривали в вакууме, остаток перекристаллизовывали из смеси гексан — этанол (50 : 1). Получали 0,35 г (70 %) 4,6-ди-трет-бутил-2-[(N-пропаноил)амино]фенола, т. пл. 161—162 °С. ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, 100 МГц), δ, м. д.: 8,44 с (1H, OH), 7,24 уш с (1H, NH), 7,20 д (1H, CH; J = 2,4), 6,74 д (1H, CH; J = 2,4), 2,50 кв (2H, CH<sub>2</sub>), 1,42 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,26 т (3H, CH<sub>3</sub>), 1,26 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*, (*I*<sub>отн</sub>): 277 (M<sup>+</sup>, 12).

**4,6-Ди-трет-бутил-2-[(N-бутаноил)амино]фенол (4).** К охлажденной до 0 °С смеси 1,00 г (45,2 ммоль) 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола и 0,64 г (63,2 ммоль) триэтиламина в 10 мл ТГФ добавляли по каплям 0,64 г (63,2 ммоль) бутаноилхлорида в 15 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 30 мин, отфильтровывали гидрохлорид триэтиламина, фильтрат упаривали в вакууме, остаток перекристаллизовывали из смеси гексан — этанол (50 : 1). Получали 0,94 г (72 %) 4,6-ди-трет-бутил-2-[(N-бутаноил)амино]фенола, т. пл. 150—151 °С. ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, 100 МГц), δ, м. д.: 8,46 с (1H, OH), 7,49 уш с (1H, NH), 7,21 д (1H, CH; J = 2,4), 6,75 д (1H, CH; J = 2,4), 2,36 т (2H, CH<sub>2</sub>), 1,71 м (2H, CH<sub>2</sub>), 1,42 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,26 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,00 т (3H, CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*, (*I*<sub>отн</sub>): 291 (M<sup>+</sup>, 9).



**2-Гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-N-фениланилин (5)** [3]. Смесь 6,60 г (29,7 ммоль) 3,5-ди-трет-бутил-пирокатехина, 2,86 г (30,7 ммоль) анилина и 0,29 г (2,9 ммоль) триэтиламина перемешивали в 45 мл гексана 6 ч при комнатной температуре. Затем раствор упаривали досуха в вакууме и перекристаллизовывали остаток из гексана. Получали 7,10 г (80 %) 2-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-N-фениланилина, т. пл. 150—151 °С (лит. данные:  $T_{пл} = 150—152$  [3]). ПМР-спектр ( $CDCl_3$ , 100 МГц),  $\delta$ , м. д.: 7,22 д (1H, CH;  $J = 2,3$ ), 7,00 д (1H, CH;  $J = 2,3$ ), 7,16—6,57 м (5H, 5CH), 6,36 уш с (1H, OH), 4,83 уш с (1H, NH), 1,43 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,24 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ , ( $I_{отн}$ ): 297 ( $M^+$ , 100).

**4,6-Ди-трет-бутил-2-[(4-метилфенил)амино]фенол (6)**. Смесь 0,30 г (1,4 ммоль) 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина, 0,15 г (1,4 ммоль) пара-толуидина и 0,01 г (0,1 ммоль) триэтиламина в 5 мл толуола кипятили в течение 10 ч, упаривали в вакууме, остаток дважды перекристаллизовывали из гексана. Получали 0,25 г (60 %) 4,6-ди-трет-бутил-2-[(4-метилфенил)амино]фенола, т. пл. 146 °С. ПМР-спектр ( $CDCl_3$ , 100 МГц),  $\delta$ , м. д.: 7,19 д (1H, CH;  $J = 2,6$ ), 7,00 д (1H, CH;  $J = 2,6$ ), 6,99 д (2H, 2CH;  $J = 8,2$ ), 6,56 д (2H, 2CH;  $J = 8,2$ ), 6,43 с (1H, OH), 4,82 уш с (1H, NH), 2,24 с (3H, CH<sub>3</sub>), 1,42 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,24 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ , ( $I_{отн}$ ): 311 ( $M^+$ , 100).

**4,6-Ди-трет-бутил-2-[(4-метоксифенил)амино]фенол (7)**. Смесь 0,65 г (2,9 ммоль) 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина, 0,38 г (3,1 ммоль) пара-метоксианилина и 0,03 г (0,3 ммоль) триэтиламина кипятили в 20 мл сухого гексана в течение 7 ч. Затем охлаждали до -15 °С, отфильтровывали выпавшие кристаллы и дважды перекристаллизовывали их из гексана. Получали 0,82 г (85 %) 4,6-ди-трет-бутил-2-[(4-метоксифенил)амино]фенола, т. пл. 136 °С. ПМР-спектр ( $CD_3COCD_3$ , 100 МГц),  $\delta$ , м. д.: 7,16 с (1H, OH), 7,15 д (1H, CH;  $J = 2,4$ ), 7,05 д (1H, CH;  $J = 2,4$ ), 6,77—6,70 м (4H, 4CH), 3,70 с (3H, CH<sub>3</sub>), 2,85 уш с (1H, NH), 1,45 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,25 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ , ( $I_{отн}$ ): 327 ( $M^+$ , 100).

**N-(2-метокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)ацетамид (8)**. Смесь 0,10 г 4,6-ди-трет-бутил-2-[(N-ацетил)амино]фенола (0,38 ммоль), 0,26 г (1,90 ммоль) карбоната калия и 0,10 г (0,79 ммоль) диметилсульфата в 5 мл сухого ацетона кипятили 6 ч. Затем осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток дважды перекристаллизовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0,06 г (57 %) N-(2-метокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)ацетамида, т. пл. 190 °С. ПМР-спектр ( $CDCl_3$ , 100 МГц),  $\delta$ , м. д.: 8,02 д (1H, CH;  $J = 2,0$ ), 7,40 уш с (1H, NH), 7,09 д (1H, CH;  $J = 2,0$ ), 3,73 с (3H, CH<sub>3</sub>), 2,20 с (3H, CH<sub>3</sub>), 1,31 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,27 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ , ( $I_{отн}$ ): 277 ( $M^+$ , 37).

**N-(2-метокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)анилин (9)**. Смесь 0,59 г (2,0 ммоль) 2-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-N-фениланилина, 1,38 г (10,0 ммоль) карбоната калия, 0,50 г (4,0 ммоль) диметилсульфата кипятили в 5 мл сухого ацетона в течение 6 ч. Смесь фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток дважды перекристаллизовывали из водно-этанольной смеси (4 : 1). Получали 0,45 г (62 %) N-(2-метокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)анилина, т. пл. 74—75 °С. ПМР-спектр ( $CDCl_3$ , 100 МГц),  $\delta$ , м. д.: 7,36—6,78 м (8H, 7CH, NH), 3,69 с (3H, CH<sub>3</sub>), 1,38 с (9H, 3CH<sub>3</sub>), 1,25 с (9H, 3CH<sub>3</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ , ( $I_{отн}$ ): 311 ( $M^+$ , 63).

## Приготовление растворов и облучение

Для приготовления деаэрированных образцов этанол и н-гексан предварительно продували аргоном высокой чистоты (99,9 %) в течение часа, затем растворяли в нем навески соединений, помещали растворы в стеклянные ампулы, продували аргоном еще 30 мин и запаивали. Концентрация соединений в исследуемых растворах составила  $10^{-3}$  М.

Приготовленные образцы облучали на установке ЛМБ- $\gamma$ -М с  $\text{Cs}^{137}$ . Мощность поглощенной дозы  $\gamma$ -установки определялась ферросульфатным дозиметром и составляла  $0,32 \pm 0,01$  Гр/с. Интервал используемых поглощенных доз составил 0,29—1,92 кГр.

## Определение молекулярных продуктов свободнорадикальных трансформаций

Анализ продуктов свободнорадикального окисления н-гексана (гексан-2-ола, гексан-3-ола, гексан-2-она, гексан-3-она) осуществляли газохроматографическим методом на кварцевой капиллярной колонке RTX-Wax (длина — 30 м, внутренний диаметр — 0,32 мм, толщина пленки неподвижной фазы — 0,5 мкм) на хроматографе GC-17AAF/APC (Shimadzu) с пламенно-ионизационным детектором. Условия анализа: начальная температура — 60 °С; скорость подъема до температуры 180 °С — 8 °С/мин; температура испарителя 250 °С; температура детектора 220 °С; скорость газа-носителя азота — 30 см/с. Минимально определяемая концентрация гексанонов и гексанолов составляла  $10^{-7}$  М.

Анализ продуктов рекомбинации радикалов н-гексана (4,5-диэтилоктана, 5-метил-6-этилнонана, 5,6-диметилдекана) осуществляли газохроматографическим методом на кварцевой капиллярной колонке DB-5 (длина — 30 м, внутренний диаметр — 0,54 мм, толщина пленки неподвижной фазы — 1,5 мкм) на хроматографе GC-17AAF/APC (Shimadzu) с пламенно-ионизационным детектором. Условия анализа: начальная температура — 100 °С; скорость подъема до температуры 200 °С — 8 °С/мин; скорость подъема до температуры 270 °С — 10 °С/мин; температура испарителя — 250 °С; температура детектора — 230 °С; скорость газа-носителя азота — 30 см/с. Минимально определяемая концентрация додеканов составляла  $10^{-7}$  М.

Анализ продукта рекомбинации  $\alpha$ -гидроксиалкильных радикалов этанола (2,3-бутандиола) проводили газохроматографическим методом на кварцевой капиллярной колонке RTX-Wax (длина — 30 м, внутренний диаметр — 0,32 мм, толщина пленки неподвижной фазы — 0,5 мкм) на хроматографе GC-17AAF/APC (Shimadzu). Условия анализа: начальная температура — 40 °С; скорость подъема до температуры 200 °С — 8 °С/мин; изотермический режим — 3 мин; температура испарителя — 250 °С; детектор — пламенно-ионизационный; температура детектора — 220 °С; скорость газа-носителя азота — 30 см/с. Минимально определяемая концентрация 2,3-бутандиола составляла  $10^{-5}$  М.

### Исследования на фагоцитарной модели *in vitro*

Перитонеальные макрофаги получали в асептических условиях промыванием брюшной полости крыс-самцов (180—250 г) 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), после чего центрифугировали (400 g — 5 мин), сливали надосадочную жидкость и ресуспендировали клетки в свежей среде Хенкса без индикатора. Продукцию АФК суспензией макрофагов определяли методом люминолзависимой хемилюминесценции на люминометре LKB-Wallac 1251—002 (Финляндия) при температуре 37 °С в пробах, содержащих  $10^6$  жизнеспособных макрофагов, люминол ( $7 \cdot 10^{-5}$  М), опсонизированный зимозан ( $5 \cdot 10^7$  частиц/мл). Испытуемые вещества растворяли в 50 % диметилсульфоксиде ( $10^{-2}$  М) и вносили в пробы в концентрациях  $10^{-9}$ — $10^{-5}$  М перед добавлением зимозана. Контролем служили пробы, содержащие растворитель, добавляемый в аналогичном объеме. Эффективные ингибирующие концентрации ( $EC_{50}$ ,  $EC_{90}$ ), служившие мерой антиоксидантной активности веществ, определяли регрессионным анализом по результатам 5—8 повторных экспериментов.

### Исследование антивирусной активности

В работе был использован вирус простого герпеса I типа (ВПГ-I). Антивирусную активность определяли методом оценки цитопатического эффекта на монослойной культуре клеток рабдомиосаркомы человека с вирусом простого герпеса типа I по описанной ранее методике [25]. Тестируемые соединения предварительно растворяли в 10 % этаноле. Необходимые концентрации соединений получали путем последовательных разведений этого раствора в среде 199 (Sigma Chemical Co). Критерием противовирусного действия соединений считали снижение титра вируса в сравнении с контролем. Вычисляли концентрации, вызывающие 50 % ( $EC_{50}$ ) и 90 % ( $EC_{90}$ ) подавление размножения вируса. Максимально переносимые концентрации соединений для неинфицированных культур клеток определяли после 72 ч инкубации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E. De // Clin. Microbiol. Rev. 1997. Vol. 10. P. 674—930.
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, 1999.
3. Средство против вируса герпеса: пат. 6594 Респ. Беларусь.
4. Противовирусное средство для лечения инфекций, вызванных вирусом простого герпеса: пат. 6503 Респ. Беларусь.
5. Iwatsuki M., Komuro E., Niki E. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1995. Vol. 68. P. 620—624.
6. Yamamura T., Suzuki K., Yamaguchi T., Nishiyama T. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1997. Vol. 70. P. 413—419.

7. *Ksendzova G. A., Sorokin V. L., Edimecheva I. P., Shadyro O. I.* // Free Rad. Res. 2004. Vol. 38. P. 1183—1190.
8. *Ксендзова Г. А., Сорокин В. Л., Едимечева И. П., Шадыро О. И.* // Химия высок. энергий. 2004. Т. 37. С. 411—415.
9. *Вольева В. Б., Прокофьева Т. И., Прокофьев А. И. и др.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1995. № 9. С. 1789—1793.
10. *Shadyro O. I.* Radiation-induced free radical fragmentation of cell membrane components and the respective model compounds // Free Radicals in Biology and Environment / F. Minisci (Ed.). Netherlands, 1997. P. 317—329.
11. Aspects of Hydrocarbon Radiolysis, Academic Press / T. Gäuman, J. Hoigne (Eds.) / L.; N. Y., 1968.
12. *Kunjappu I. T., Rao K. N.* // Rad. Phys. Chem. 1979. Vol. 13. P. 97—100.
13. *Sonntag C. von.* The Chemical Bases of Radiation Biology. L., 1987.
14. *Sonntag C. von, Schuchmann H.-P.* Carbohydrates // Radiation Chemistry: Present Status and Future Trends, Elsevier / C. D. Jonah, B. S. M. Rao (Eds.). Amsterdam, 2001. P. 481—511.
15. *Davies M. J., Gilbert B. C.* // Advances in Detailed Reaction Mechanisms / J. M. Coxon (Ed.). Greenwich, 1991. Vol. 1. P. 36—81.
16. *Gilbert B. C., King D. M., Thomas C. B.* // Carbohydr. Res. 1984. Vol. 125. P. 217—235.
17. *Muller S. N., Batra R., Senn M. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119. P. 2795—2803.
18. *Shadyro O. I., Yurkova I. L., Kisel M. A. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 2004. Vol. 36. P. 1612—1624.
19. *Edimecheva I. P., Kisel R. M., Shadyro O. I.* // J. Radiat. Res. 2005. Vol. 46. P. 1765—1770.
20. *Freeman G. R.* Labile species and fast processes in liquid alcohol radiolysis // The Study of Fast Processes and Transient Species by Pulse Electron Radiolysis / I. H. Baxendale, F. Busi (Eds.). Dordrecht, 1982. P. 399—416.
21. *Easmon C. F. S., Cole P. J., Williams A. J., Hastings M.* // Immunology. 1980. Vol. 41. P. 67—74.
22. *Babior B. M.* // Blood. 1999. Vol. 93. P. 1464—1476.
23. *Наумчик И. В., Карасева Е. И., Метелица Д. И. и др.* // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 66—75.
24. *Григоренко Ю. А., Карасева Е. И., Метелица Д. И. и др.* // Биомед. химия. 2007. Т. 53, № 5. С. 566—576.
25. *Baltina L. A., Flekhter O. B., Nigmatullina L. R. et al.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. Vol. 13. P. 3549—3552.