
ХИМИЯ

УДК 541.64: 546.26

СИНТЕЗ ПОЛИ-N,N-ДИАЛЛИЛАМИНОБУТАНДИОВОЙ КИСЛОТЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ТЕСТ-СИСТЕМЕ DROSOFILA MELANOGASTER

Бегиева М.Б.*, Гудова Ю. Х., Хашхожева Д.А.,
Суншева Б.М., Бегиева М.Х., Паритов А.Ю., Хараев А.М.

Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова

*madibeg@mail.ru

Получен мономер N,N-диаллиламинобутандиовая кислота и полимер на его основе. Структура мономера и полимера подтверждена физико-химическими методами. На тест-системе Drosophila melanogaster исследованы токсичные свойства поли-N,N-диаллиламинобутандиовая кислоты. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что поли-N,N-диаллиламинобутандиовая кислота в концентрациях равной 1 % не обладает токсическим эффектом.

Ключевые слова: мономер, полимер, синтез, поли-N,N-диаллиламинобутандиовая кислота, токсичность.

SYNTHESIS OF POLY-N,N-DIALLYLAMINOBTANEDIOIC ACID AND INVESTIGATION OF HIS MUTAGENIC ACTION ON THE TEST SYSTEM DROSOFILA MELANOGASTER

Begieva M.B., Gudova Yu.Kh., Khashkozheva D.A.,
Sunsheva B.M., Begieva M.Kh., Paritov A.Yu., Kharaev A.M.

Kabardino-Balkarian State University

The resulting monomer is N,N-diallylaminobutanedioic acid and a polymer based on it. The structure of the monomer and polymer is confirmed by physicochemical methods. The toxic properties of poly-N,N-diallylaminobutanedioic acid were investigated on the Drosophila melanogaster test system. The results obtained allow us to conclude that poly-N,N-diallylaminobutanedioic acid in concentrations of 1 % does not have a toxic effect.

Keywords: poly-N,N-diallylaminobutanedioic acid, monomer-N,N-diallilaminobutanedioic acid, polymer, toxicity monomer.

Азотсодержащие синтетические полиэлектролиты диаллильной природы могут быть использованы в качестве коагулянтов, флокулянтов, структураторов почв, а также для очистки питьевых и сточных вод [1–3]. Поэтому перед химической наукой поставлены новые задачи по расширению ассортимента полиэлектролитов диаллильной природы, которые обладали бы целым комплексом ценных свойств, в том числе, с регулируемым гидрофильно-гидрофобным и кислотно-основными свойствами, а также наличием биологической активности, что является актуальной проблемой.

Интересными по своим свойствам азотсодержащими соединениями являются аминокислоты, и в частности, аспарагиновая кислота. Полимер, полиаспарагиновая кислота, получаемая твердофазной поликонденсацией аспарагиновой кислоты нашла широкое применение в виде биоразлагаемых и биосовместимых материалов. Основной продукт аспарагиновой кислоты, полисукцинимид, может быть модифицирован в полиамид. Введение в структуру аминокислоты аллильных и диаллильных групп способствует расширению ассортимента новых перспективных классов соединения с более простыми и экономичными способами получения полимерных продуктов методом радикальной полимеризации, свойства которых мало изучены и представляются весьма перспективными.

В связи с этим целью настоящей работы является синтез мономера и полимера производного диаллиламина введением в структуру диаллиламина карбоксильной группы $-\text{COOH}$ и N-алкильного заместителя различной длины, а также осуществления оценки токсического потенциала поли-N,N-диаллиламинобутандиовой кислоты.

В экспериментах использовали реагенты отечественного производства квалификации х.ч.

Исходные вещества

Получение N,N-диаллиламинобутандиовой кислоты

N,N-диаллиламинобутандиовую кислоту (ДААсК) получали алкилированием α -аминобутандиовую кислоту хлористым (бромистым) аллилом. Ход работы был следующим: в водно-спиртовом растворе α -аминоэтановую кислоту превращают в натриевую соль воздействием раствора щелочи, затем при температуре $0-5^\circ\text{C}$ добавляют капли хлористого аллила в течение 15–30 мин, температуру синтеза доводят до $60-75^\circ\text{C}$ и синтез проводят при данной температуре в течение 3–5 часов, что приводит к получению N,N-диаллиламинобутандиовой кислоты (ДААсК). После окончания реакции реакцию смесь постепенно вливают в сухой ацетон порциями. N,N-диаллиламинобутандиовая кислота в виде хлопьев собирается на поверхности ацетона, при этом соли выпадают в осадок. Хлопья отфильтровывают на воронке Бюхнера, тщательно промывают сухим ацетоном, затем в эксикаторе сушат над оксидом фосфора (V) до постоянного веса. N,N-диаллиламинобутандиовая кислота – мономер светло-желтого цвета. Мономер плавится с разложением при $292\pm 2^\circ\text{C}$. ($T_{\text{пл}}$ α -аминобутандиовой кислоты 270°C^{-1} с разложением). Выход мономера 75 % [4–6].

Структура синтезированного мономера-N,N- диаллиламинобутандиовой кислоты подтверждена ИК- и ^{13}C -ЯМР спектроскопией.

Методы анализа

Спектры ^{13}C -ЯМР, ^1H -ЯМР синтезированных мономеров регистрировались на спектрометре WP-80 фирмы «Брукер» с рабочей частотой на ядрах ^{13}C 10.115 МГц, при температуре $35-40^\circ\text{C}$. В качестве стандарта использовали внешний эталон. Химические сдвиги ^{13}C -ЯМР приведены в δ -шкале и определялись относительно внешнего стандарта по формуле:

$$\delta_{\text{ТМС}} = \delta + 49,5 \text{ м.д.}$$

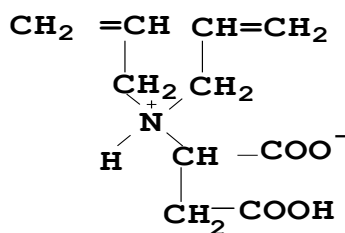
Точность измерения химических сдвигов составила $\pm 0,03$ м.д. ИК-спектры регистрировались на Specord M-82 в области $4000-400 \text{ см}^{-1}$. Тонко измельченный образец полимера смешивали с порошком KBr и прессовали под большим давлением в прозрачные тонкие диски. Толщина полученного диска 1 мм, диаметр 12 мм, пропускание 95 %.

Значения характеристической вязкости поли-N,N-диаллиламинобутандиовой кислоты были определены вискозиметрическим методом в 0,1 н растворе NaCl при 25°C . Молекулярные массы определяли по формуле Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = 1,12 \times 10^{-4} M^{0,82}.$$

Коэффициенты K и α были определены для 1 н раствора NaCl при 25°C [7].

Научный интерес к исследованию ДААсК обусловлен тем, что эти мономеры принадлежат к аллильному классу соединений, являются водорастворимыми мономерами, отличающимися длиной N-алкильного заместителя и содержанием карбоксильных групп, а также обладают возможностью создания нового семейства высокомолекулярных полиаминов с регулируемым гидрофильно-гидрофобным балансом и кислотно-основными свойствами, широкими возможностями для химической модификации и биологической активностью.



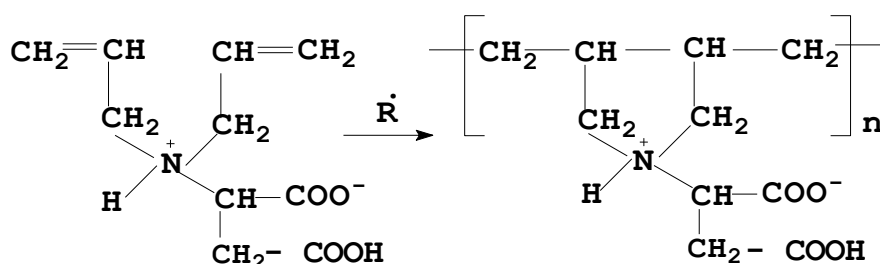
N,N-диаллиламинобутандиовая кислота

Для синтеза N,N-диаллиламинобутандиовой кислоты – мономера диаллильной природы, в молекуле которых содержались бы как положительно, так и отрицательно заряженные функциональные группы, нами проводились реакции алкилирования α-аминокарбоновых кислот хлористым аллилом.

Идентификацию образующегося продукта проводили сравнением полос поглощения характеристических групп ИК – спектров. В аминокислоте присутствуют две функциональные группы –NH₂ и –COO[–], для которых характерны полосы поглощения в области 3100–3400 см^{–1} для ассоциированной группы NH₂ и в области 1725–1680 см^{–1} для карбоксильной группы –COO[–]. Аналитическим сигналом, служащим подтверждением реакции алкилирования, является присутствие в спектре интенсивного поглощения в области 1620 см^{–1}, что характерно для присутствия C=C-группы. Не наблюдается полоса поглощения в области 1750–1735 см^{–1}, что свидетельствует об отсутствии сложноэфирной группы COO[–], и присутствует интенсивная полоса поглощения в области 1485 см^{–1}, характерная для деформационных колебаний N⁺R₃-группы.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что нами получен мономер, в структуре которого имеются как положительно заряженные, так и отрицательно заряженные группы.

Радикальную полимеризацию N,N-диаллиламинобутандиовой кислоты осуществляли в водных растворах. Проведение реакции полимеризации без инициаторов радикального характера показало, что реакция практически не протекает. Поли-N,N-диаллиламинобутандиовая (ПДААК) кислота образуется по следующей схеме:



Полученные результаты открывают возможность создания нового семейства высокомолекулярных полиаминов с регулируемым гидрофильно-гидрофобным балансом и кислотно-основными свойствами, обладающих широкими возможностями для химической модификации и для очистки сточных и питьевых вод. Однако вопрос использования синтетического полиэлектролита для очистки сточных и питьевых вод ставит перед научным сообществом решение не менее актуальной проблемы – химизации биосферы и токсичности.

Понятие генетического риска вещества включает в себя оценку возможных либо реальных генетических последствий его применения, в первую очередь, для человека. Информацию о генотоксичных свойствах химических соединений получают в ходе тестирования с использованием различных тест-систем. Эти тест-системы отличаются филогенетической близостью по отношению к человеку или млекопитающим, типом регистрируемого генетического эффекта (мутагенного или генотоксического), степенью их охарактеризованности, что в конечном счёте, определяет эффективность тест-систем. Методы, обладающие большей эффективностью, имеют больший вес при определении доказанности наличия или отсутствия мутагенной активности.

Одним из самых удобных и широкоупотребимых тестов на генотоксичность является метод использования *Drosophila melanogaster*. Четыре наиболее важные особенности дрозофилы делают ее незаменимым объектом для изучения специальных вопросов генетики. К этим особенностям относятся: быстрый срок развития, от яйца до взрослой мухи; исключительно высокая плодовитость; богатство наследственных рас или мутаций, обнаруженных в ее культурах в лабораторных условиях; малое число хромосом.

В нашей работе по изучению токсического действия ПДААсК были использованы линии D-32 *Drosophila melanogaster*, поддерживаемые в культуре на кафедре физиологии, генетики и молекулярной биологии КБГУ.

Выбор концентрации раствора полимера обусловлен высокими комплексообразующими свойствами при низких концентрациях в водных растворах в интервале 0,01–1,0 % [8].

В схеме проведения опыта были выделены две группы по две повторности. Для каждого варианта опыта использовали контроль.

Исследуемое вещество добавляли в концентрации 1 % водного раствора полимера, объемом 3 мл на 20 мл корма в стандартную питательную среду (дрожжи, агар-агара, сахар, манная крупа), на которой содержались мухи опытных и контрольных групп. Во всех опытных вариантах действию вещества подвергались родительские особи. Опыты проводили в двукратной повторности.

Изучали соотношения в распределении полов в опытных и контрольных вариантах у исследуемых линий дрозофилы, а также отклонения некоторых морфологических признаков. Статистическую обработку результатов проводили используя метод χ^2 . Для расчета была использована формула [9]:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}.$$

Результаты исследований представлены в табл. 1:

Таблица 1

Результаты исследований, полученных на *Drosophila melanogaster* в поколении F_1 и F_2

Контроль(F_1)				
Вещество	Самки ♀	Самцы ♂	Морфология, отклонения	Всего Σ
Чистый корм (I)	106	92	1 самец (правое крыло короткое, деформированное)	198
Чистый корм (II)	51	45	–	96
(F_1)				
1 % раствор ПДААсК (I)	89	76	1 самка (искривление крыла)	165
1 % раствор ПДААсК (II)	75	69	1 самка (искривление крыла)	144
$\chi^2 = 0,323$				
(F_2)				
1 % раствор ПДААсК (I)	53	51	1 самец, 2 самки с нарушением сегментации	104
1 % раствор ПДААсК (II)	100	91	2 самки, 2 самца с нарушением сегментации	191
$\chi^2 = 0,003$				

В биологических исследованиях принято считать, что исследуемое вещество обладает токсичностью, если χ^2 превышает 3,841. Учитывая этот фактор, необходимо отметить, что исследуемое соединение поли-N,N-диаллиламинбутандиовая кислота в концентрации раствора 1 % не проявляло мутагенного действия на потомство мушек *Drosophila melanogaster* в поколениях F_1 и F_2 и не снижало их жизнеспособность. Также следует отметить, что соотношение полов во всех вариантах опыта, включая контрольную и опытную группы, сохранялось в пропорции 1:1. Количество мушек с морфологическими отклонениями при обработке испытуемым соединением не превышало число, фиксированное в контрольной группе, что можно отнести к спонтанному мутагенезу.

Результаты эксперимента согласуются с ранее проведенными исследованиями, которые показали, что ПДААсК оказывает бактерицидное и бактериостатическое действие на различные возбудители внутрибольничных инфекций (штаммы золотистого стафилококка (*S. aureus*), штаммы кишечной палочки (*E. coli*)) в первую очередь на грамположительные бактерии [10] и является нетоксичным веществом [11].

Полученные данные позволяют предположить, что поли-N,N-диаллиламинобутандиовая кислота в концентрации 1 % не проявляет мутагенной активности на одном из валидных тестов. При повторных тестированиях и сохранении этой тенденции возможно применение данного соединения в широкой практике, а именно для очистки сточных и питьевых вод.

Библиография

1. Кабанов В.А., Топчиев Д.А. Полимеризация ионизирующихся мономеров. М.: Наука, 1975. 224 с.
2. Топчиев Д.А., Малкандуев Ю.А. Катионные полиэлектролиты ряда поли-N,N-диалкил-N,N-диаллиламмоний галогенидов: особенности процессов образования, свойства и применения. Нальчик, 1997. 240 с.
3. Арбузова И.А., Плоткина С.А. Циклическая полимеризация диаллилового эфира малеиновой кислоты // Высокомолек. соед. 1964. Т. 6, № 4. С. 662–665.
4. Патент РФ № 2473539. N,N-диаллиласпарагиновая кислота и способ ее получения / М.Б. Бегиева, А.М. Хараев, Р.Ч. Бажева, Ю.А. Малкандуев, М.Х. Лигидов. Опубликовано: 27.01.2013. Заявка № 20101311492/04 от 27.07.2013 г.
5. Патент РФ № 2476450. Поли-N,N-диаллиласпарагиновая кислота / М.Б. Бегиева, А.М. Хараев, Р.Ч. Бажева, Ю.А. Малкандуев. Опубликовано: 27.02.2013. Заявка № 20101463539 от 15.11.2010 г.
6. Бегиева М.Б., Хараев А.М., Малкандуев Ю.А. N,N-диаллиласпарагиновая кислота и полимеры на ее основе // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. 2012. № 5. С.58-63.
7. Нажметдинова Г.Т. Радикальная полимеризация галоидных солей N,N-диалкил-N,N-диаллиламмония: дисс... канд. хим. наук. М.: ИНХС АН СССР, 1983. 189 с.
8. Бегиева М.Б., Губжокова М.Б., Чеченова З.Р., Хараев А.М., Малкандуев Ю.А., Пахомов С.И., Лигидов М.Х. Комплексообразующие свойства полимеров и сополимеров на основе N,N-диаллиламинокарбоновых кислот // Известия Кабардино-Балкарского государственного университета. 2015. Т. 5, № 6. С. 27–33.
9. Бондарчук С.С., Годованная И.Г., Перевозкин В.П. Основы практической биостатистики: учебное пособие. Томск: Томский гос. пед. ун-т, 2009. 130 с.
10. Бегиева М.Б., Блиева Л.З. Хараева З.Ф. Хараев А.М. Малкандуев Ю.А. Водорастворимые азотсодержащие полиэлектролиты с бактерицидными свойствами // Фундаментальные исследования. Серия Биологические науки. 2012. № 9. Ч. 3. С. 542–544.
11. Альмова А.А., Бегиева М.Б. Определение токсического действия полимерных материалов на основе N,N-диаллиламинокислот // Фундаментальные исследования. Серия Биологические науки. 2012. № 9. Ч. 3. С. 539–541.