

На правах рукописи

Алешина Наталия Владимировна

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИОАМИДОВ НА ОСНОВЕ АЗОЛОВ И АНАЛИЗ  
ПРОДУКТОВ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МОЛЕКУЛЯРНЫМ ИОДОМ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Краснодар – 2012

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета  
ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет».

**Научный руководитель:**

доктор химических наук, профессор  
Черновьянц Маргарита Сергеевна

**Официальные оппоненты:**

Рувинский Овсей Евелевич,  
доктор химических наук, профессор,  
ФГБОУ ВПО «Кубанский  
государственный университет»  
(г. Краснодар), профессор

Мусорина Татьяна Николаевна,  
кандидат химических наук,  
ФГБОУ ВПО «Кубанский  
государственный университет»  
(г. Краснодар), старший научный  
сотрудник

**Ведущая организация:**

ГБОУ ВПО «Пятигорская  
государственная фармацевтическая  
академия Минздравсоцразвития России»  
(г. Пятигорск)

Защита диссертации состоится «22» мая 2012 г. в 14 часов в аудитории 231 на заседании диссертационного совета ДМ 212.101.16 при Кубанском государственном университете по адресу: 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Кубанского государственного университета по адресу: 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149.

Автореферат разослан «\_\_» апреля 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Киселева Наталия Владимировна

## Общая характеристика работы

**Актуальность работы.** Получение и исследование свойств новых биологически активных соединений во многом зависит от уровня развития и достижений современной аналитической химии. Гетероароматические тиамиды, синтетические органические вещества, способные участвовать в перехвате свободных радикалов благодаря наличию атома серы, а также биохимических редокс-процессах с участием иода, вызывают значительный практический интерес у специалистов-фармацевтов.

Специфические особенности антитиреоидной активности тиамидов зависят от термодинамической устойчивости их молекулярных комплексов с иодом. Весьма актуальной задачей в этой связи представляется выявление корреляционной зависимости между структурой гетероароматических тиамидов и их реакционной способностью по отношению к молекулярному иоду в полярных и неполярных средах. Представляет значительный интерес изучение протолитических свойств тиамидов, а также оценка параметров связывания препаратов с транспортными белками плазмы крови, которые определяют фармакологическую активность лекарственных препаратов и во многом влияют на их распределение в организме. Малоизученными являются вопросы оценки антиоксидантной активности гетероароматических тиамидов, взаимодействующих в организме с активными формами иода.

Среди методов определения биологически активных тиамидов в лекарственных формах и биообъектах лидирующие позиции занимают методы хроматографии, особенно в сочетании с масс-спектрометрическим методом детектирования. Существующие на сегодняшний день аналитические методики определения этих веществ характеризуются весьма сложными способами пробоподготовки, включают предварительную экстракцию и дериватизацию. Поскольку большинство антитиреоидных препаратов при физиологических условиях существуют частично в биологически активной – ионной форме, то существует потребность в разработке простых в исполнении, высокочувствительных и экспрессных электрофоретических методик разделения и анализа, применимых для мониторинга лекарственных препаратов и биообъектов.

**Цель работы** заключалась в изучении физико-химических свойств гетероароматических тиамидов с использованием зависимости «структура – свойство – антитиреоидная активность *in vitro*» и разработке на их основе комплекса методик идентификации и определения препаратов антитиреоидного действия: тиреостатиков – тиамидов на основе тиазола, тиadiaзола, триазола и тетразола.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- сравнительная оценка электронодонорной способности гетероциклических тиамидов на основе тиазола, тиadiaзола, триазола и тетразола по отношению к молекулярному иоду и определение констант устойчивости образующихся  $n-\sigma^*$ -аддуктов в неполярной среде (хлороформе);

- исследование структуры, состава и свойств продуктов взаимодействия препаратов с молекулярным иодом в полярной и неполярной средах;

- оценка протолитических свойств и констант протолитических равновесий исследуемых соединений;

- изучение взаимодействия препаратов с белком-переносчиком (бычьим сывороточным альбумином) и расчет параметров связывания (число связывающих сайтов и константы ассоциации);

- изучение антиоксидантной активности гетероциклических тиоамидов на основе тиазола, тиadiaзола, триазола и тетразола, оценка порядка и константы скорости реакции взаимодействия с хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом, разработка методики кинетического определения препаратов;

- идентификация гетероароматических соединений, основанных на зависимости их хроматографической и электрофоретической подвижности (методами ТСХ, ВЭЖХ и капиллярного зонного электрофореза) и спектроскопических характеристик (методами УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрометрии) от природы гетероцикла;

- разработка методик определения препаратов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ).

#### **Научная новизна.**

- Установлена взаимосвязь между структурой гетероароматических тиоамидов, их способностью формировать аддукты с иодом  $n$ - $\sigma^*$ -типа в неполярных средах и восстановительными свойствами по отношению к молекулярному иоду в водно-этанольных растворах;

- Изучены протолитические свойства тиоамидов ( $pK_a$  и  $pK_{BH^+}$ ), установлена взаимосвязь между структурой тиоамидов и их протолитическими свойствами;

- Изучены молекулярные и кристаллические структуры продуктов взаимодействия препаратов (5-метил-1,3,4-тиадиазолин-2-тиона в хлороформе и 1,2,4-триазолин-3-тиона и 1-метилтетразолин-5-тиона в этанольном растворе) с элементарным иодом;

- Изучена антиоксидантная активность гетероароматических тиоамидов, определены порядок и константа скорости реакции взаимодействия соединений с хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом. Разработана методика определения тиоамидов кинетическим методом;

- Исследовано связывание препаратов *in vitro* с белком-переносчиком (бычьим сывороточным альбумином) методом гашения флуоресценции, определены константы ассоциации молекулярных форм тиоамидов и сделано предположение о природе связывающих сайтов в молекуле белка.

- Установлены оптимальные условия идентификации, разделения и спектроскопического, хроматографического и электромиграционного определения гетероароматических тиоамидов.

#### **Практическая значимость.**

На основе современных методов физико-химического анализа разработаны условия идентификации, разделения и определения ряда гетероароматических тиоамидов, которые могут быть применены при биофармакологическом анализе и мониторинге биообъектов.

Выявлена зависимость антиоксидантной активности тиоамидов от природы гетероцикла и полярности растворителя. Разработана спектрофотометрическая методика кинетического определения тиоамидов в этанольных растворах, характеризующаяся хорошей прецизионностью и правильностью результатов.

Методом рентгеновского дифракционного анализа установлены кристаллические и молекулярные структуры продуктов взаимодействия

препаратов: 5-метил-1,3,4-тиадиазолин-2-тиона в хлороформе и 1,2,4-триазолин-3-тиона и 1-метилтетразолин-5-тиона в этанольном растворе с элементарным иодом.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. Результаты спектроскопических и потенциометрических исследований взаимодействия гетероароматических тиоамидов - производных тиазола, тиадиазола, триазола и тетразола - с молекулярным иодом в различных средах. Данные по установлению влияния структуры тиоамидов на устойчивость их  $n-\sigma^*$ -комплексов с иодом в хлороформных растворах и восстановительную активность в водно-спиртовых растворах.

2. Данные по оценке влияния структуры тиоамидов на их протолитические свойства.

3. Результаты исследования равновесия и оценка констант ассоциации тиреостатических препаратов на основе тиазола, тиадиазола, триазола и тетразола с транспортным белком альбумином методом гашения флуоресценции.

4. Результаты исследования кристаллических и молекулярных структур соли пентаиодида бис(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-илтио)иодония и дисульфидов - 3,3'-дитиобис(1Н, 2, 4-триазола) и 5,5'-дитиобис(1-метил-1Н-тетразола) – продуктов взаимодействия тиоамидов с элементарным иодом.

5. Комплекс разработанных спектроскопических (ИК-, УФ-, ЯМР-, масс-спектрометрия) и хроматографических (ТСХ, ВЭЖХ, КЗЭ) методик идентификации и определения гетероароматических тиоамидов.

6. Результаты исследования антиоксидантной активности тиоамидов на основе тиазола, тиадиазола, триазола и тетразола и методика их кинетического определения.

7. Практическое применение методики ВЭЖХ-УФ определения тиреостатика тиазолидин-2-тиона в моче здорового человека.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на VII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды “Экоаналитика-2009” (Июшкар-Ола, 2009 г.), XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2010 г.), IV Международной научно-практической конференции “Наука и современность” (Новосибирск, 2010 г.), Всероссийской конференции “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” (Краснодар, 2010 г.), Всероссийской очно-заочной конференции “Современные проблемы естествознания” (Чебоксары, 2011), XXI Российской молодежной научной конференции “Проблемы теоретической и экспериментальной химии” (Екатеринбург, 2011 г.), XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2011 г.), VII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды “Экоаналитика-2011” (Архангельск, 2011 г.).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 13 печатных работ в виде 4 статей, которые входят в список журналов, рекомендованных ВАК, материалов докладов и конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложения. Работа выполнена на 126 страницах машинописного текста, включающего 35 рисунков, 47 таблиц и библиографию из 127 наименований.

## Основное содержание работы

### Обзор литературы

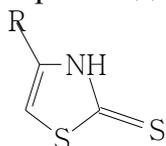
Аналитический обзор состоит из двух разделов, посвященных структурной и аналитической химии гетероароматических тиоамидов – лекарственных препаратов тиреостатического действия. В первом разделе обобщены структурные исследования продуктов взаимодействия препаратов антитиреоидного действия (гетероароматических тиоамидов) с иодом. Показано (в основном по данным рентгеноструктурного анализа и Рамановской спектроскопии), что структурные параметры молекулярных комплексов зависят от типа гетероатома и характера заместителя в гетерокольце. Приведена модель ингибирующего действия препаратов-тирестатиков на биосинтез гормонов щитовидной железы.

Во втором разделе представлены широко применяемые в фармацевтической и клинической практике методы идентификации и определения препаратов тиреостатического действия. На основе анализа приведенных в научной литературе данных сформулированы задачи для достижения поставленной в работе цели.

### Объекты исследования

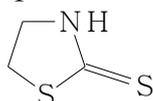
В работе исследовались традиционно используемые препараты и потенциальные тиреостатики – гетероароматические тиоамиды:

#### I-II: производные тиазола



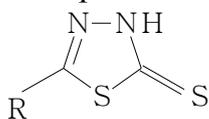
№	R	Название соединения
I	H	тиазолин-2-тион
II	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-фенилтиазолин-2-тион

#### III: производное тиазолина



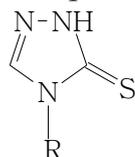
тиазолидин-2-тион

#### IV-V: производные 1,3,4-тиадиазола



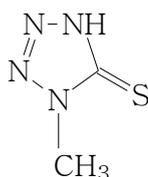
№	R	Название соединения
IV	H	1,3,4-тиадиазолин-2-тион
V	CH <sub>3</sub>	5-метил-1,3,4-тиадиазолин-2-тион

#### VI-VII: производные 1,2,4-триазола



№	R	Название соединения
VI	H	1,2,4-триазолин-3-тион
VII	CH <sub>3</sub>	4-метил-1,2,4-триазолин-3-тион

#### VIII: производное тетразола



1-метилтетразолин-5-тион

### Исследование взаимодействия гетероароматических тиамидов с иодом в малополярных средах

Реакция между гетероароматическими тиамидами и иодом в малополярных растворителях приводит к образованию  $n-\sigma^*$  аддуктов, в основном состава 1:1, посредством донирования электронной плотности с ВЗМО тиамида на НСМО молекулы иода.

В системе тиамид – элементарный иод в хлороформе спектрофотометрическим методом сдвига равновесия исследовано образование молекулярных комплексов тиамид- $I_2$ . Константы устойчивости молекулярных аддуктов ( $\beta$ ) и количество молекул иода, координируемых одной молекулой тиамида, рассчитывали с использованием функции «среднеиодное число» ( $\bar{n}_{I_2}$ ), характеризующей количество молекул иода, координируемых одной молекулой тиамида. Равновесная концентрация иода  $[I_2]$  рассчитывалась из оптической плотности в максимуме полосы поглощения иода (510 нм) по уравнению  $[I_2] = A/(\varepsilon \cdot l)$ , где  $\varepsilon$  – молярный коэффициент светопоглощения молекулярного иода;  $l$  – толщина поглощающего слоя. Для каждой равновесной концентрации иода определено соответствующее значение функции  $\bar{n}_{I_2}$  по уравнению  $\bar{n}_{I_2} = (C_{I_2} - [I_2])/C_D$ , где  $C_D$  – общая концентрация тиамида. Если значения среднеиодного числа находятся в пределах  $0 < \bar{n}_{I_2} < 1$ , то расчет констант устойчивости выполняется по формуле  $\bar{n}_{I_2}/(1 - \bar{n}_{I_2}) = \beta[I_2]$ . Установлено, что в малополярной среде (хлороформе) исследуемые тиамиды взаимодействуют с элементарным иодом, образуя молекулярные аддукты в соотношении 1:1, константы устойчивости которых представлены в логарифмических единицах в табл. 1.

Таблица 1

Результаты спектрофотометрического определения констант устойчивости  $\sigma$ -комплексов тиамидов (I-VIII) с молекулярным иодом в хлороформе

	производные тиазола		производное тиазолина	производные 1,3,4-тиадиазола		производные 1,2,4-триазола		производное тетразола
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
$\lg\beta$	2.90	2.87	3.66	2.60	3.09	2.56	3.16	3.87

Поскольку производные тиазола, тиазолина, 1,3,4-тиадиазола, 1,2,4-триазола и тетразола образуют малоустойчивые комплексы с молекулярным иодом, их тиреостатическое действие в организме, возможно, связано с ингибированием селенсодержащего фермента - иодтирониндеиодиназы (ID-SeH), ответственного за превращение прогормона  $T_4$  в гормон  $T_3$ .

## Исследование молекулярных и кристаллических структур продуктов взаимодействия исследуемых тиоамидов с иодом

Помимо исследований продуктов взаимодействия гетероароматических тиоамидов с молекулярным иодом в растворе нами выделялись эти соединения с целью их идентификации. Исследования проводились методом РСА\*. Кристаллическая структура продукта взаимодействия тиона (V) с молекулярным иодом, полученного в хлороформном растворе при молярном соотношении тиона и иода 1:2, образована иодониевыми катионами  $(C_3H_4N_2S_2)_2I^+$  и пентаиодид-анионами  $I_5^-$  (рис. 1), объединенными в цепочки, вытянутые вдоль оси *c*, межмолекулярными водородными связями N(4)...H-N(1') и I(1)...H-N(3') (рис. 2).

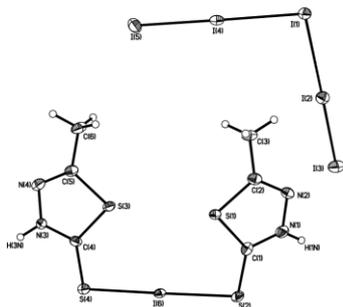


Рисунок 1 – Структура соединения  $[(C_3H_4N_2S_2)_2I^+]I_5^-$

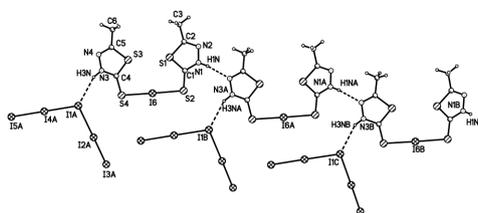


Рисунок 2 – Цепочки молекул, объединенные за счет водородных связей, расстояния N(4)...H-N(1') 2.16 Å, I(1)...H-N(3') 2.74 Å

Характерной особенностью кристаллического соединения является образование сдвоенных цепочек за счет различных диполь-дипольных взаимодействий между атомами иода и серы. Сдвоенные цепочки объединяются в слои, параллельные плоскости *ac* (рис. 3), в которых реализуется большое количество контактов иод-сера и сера-сера; кратчайшие контакты: I(2)...S(1') (3.846(2)Å) и S(4)...S(4') (3.645(2)Å).

\* РСА выполнен Стариковой З.А., ст.н.с. Института элементоорганических соединений им. Несмеянова Российской академии наук

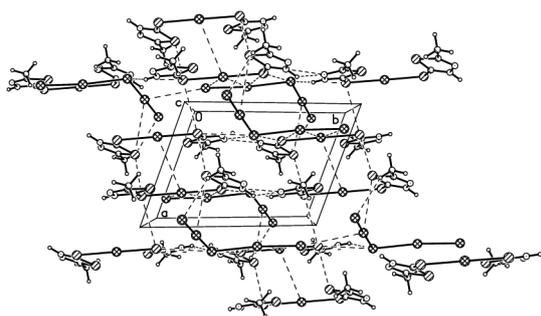


Рисунок 3 – Образование слоев за счет контактов иод...иод и иод...сера; показаны кратчайшие контакты S...S и I...S

Кристаллы 3,3'-дитиобис(1H,2,4-триазола) получены смешением этанольных растворов 1,2,4-триазиолин-3-тиона и молекулярного иода в молярном соотношении 1:1 с последующим медленным выпариванием растворителя на воздухе.

Молекулы 3,3'-дитиобис(1H-триазола) соединяются в бесконечные цепи посредством N(2)H...N(3B) взаимодействий атомов азота триазольных колец (атом пиррольного типа действует как донор водородной связи) (рис. 4). Цепи молекул формируют слои посредством диполь-дипольных взаимодействий S...N1 (3.190(1)Å).

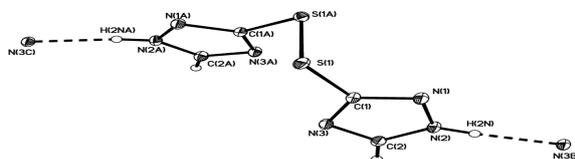


Рисунок 4 – Структура соединения C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

Добавочные взаимодействия N(2)H...N(3B) и S...N(1) способствуют дальнейшей стабилизации структуры. Кристаллическая упаковка слоев, параллельных плоскости 011, показана на рис. 5.

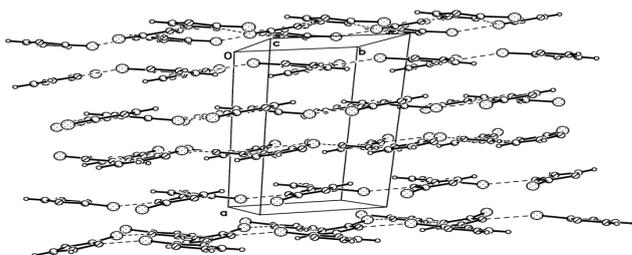


Рисунок 5 – Кристаллическая упаковка слоев, параллельных плоскости 011

5,5'-Дитиобис(1-метил-1Н-тетразол) синтезирован смешением этанольных растворов 1-метилтетразолин-5-тиона и иода в молярном соотношении 1:1.

Молекулярная структура 5,5-дитиобис(1-метил-1Н-тетразола) показана на рис. 6.

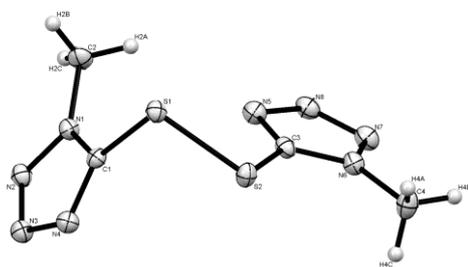


Рисунок 6 – Структура соединения  $C_4H_6N_8S_2$

В кристаллической упаковке наблюдаются сильное взаимодействие между S(1) и N(3<sup>i</sup>), межатомное расстояние 3.0179(17) Å, на 0.33 Å короче, чем сумма ван-дер-Ваальсовых радиусов. Это самый короткий межмолекулярный контакт между гетероциклическим атомом азота и ациклическим дисульфидным атомом серы, зарегистрированный в Кембриджской структурной базе данных.

Соединенные по принципу “голова к хвосту” молекулы дисульфида формируют бесконечные одномерные зигзагообразные цепочки, которые протянуты вдоль оси кристалла *b*, как показано на рис. 7. Эти цепочки формируются вследствие взаимодействий, в которые включается лишь один из двух тетразольных фрагментов, представленных в молекуле (с атомами S(1) и C(1)).

Бесконечные одномерные супрамолекулярные цепочки образуют двухмерный слой (который параллелен 011 плоскости) путем взаимодействий, в которых участвует “второй” тиотетразольный фрагмент (с S(2) и C(3) атомами). Взаимодействие между бесконечными цепочками довершается  $\pi$ - $\pi$  стэкинговыми взаимодействиями (рис. 7).

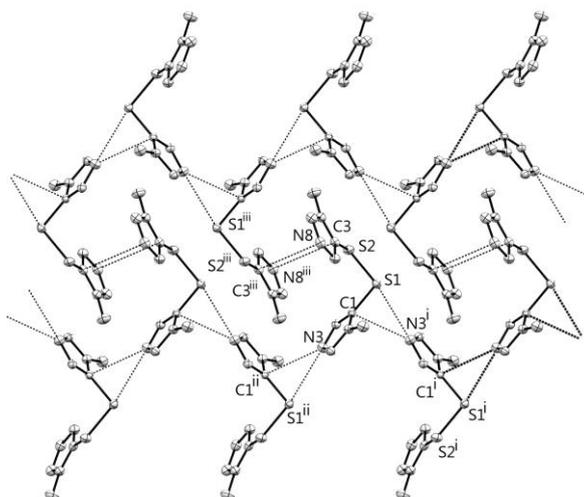


Рисунок 7 – Супрамолекулярные взаимодействия в кристаллической структуре  $C_4H_6N_8S_2$  (атомы водорода пропущены для ясности рисунка). Коды симметрии: (i) 1-x, -1/2+y, 1/2-z; (ii) 1-x, 1/2+y, 1/2-z; (iii) 1-x, 2-y, -z

## Потенциометрическое (иодиметрическое) определение тиамидов

Адиабатические потенциалы ионизации молекул тиолов (тионов) достаточно низкие, это обуславливает легкость их окисления с образованием тиильных радикалов в результате потери атома водорода. Реакция окисления особенно быстро протекает в полярных растворителях. Тиильные радикалы димеризуются с образованием дисульфидов:  $DS \cdot + \cdot SD \rightarrow DSSD$ . Для определения тиамидов в водно-этанольном растворе 1:1 нами было применено обратное потенциометрическое титрование. Точку эквивалентности фиксировали иономером «ЭВ-74» в режиме вольтметра и визуально по обесцвечиванию титруемого раствора. Степень протекания реакции ( $\omega$ ) определяли по формуле  $\omega = \frac{V_{I_2} \cdot C_{I_2} - V_{Na_2S_2O_3} \cdot C_{Na_2S_2O_3}}{1000 \cdot v_0} \cdot 100\%$ ,

где  $v_0$  – количество тиамида, моль;  $V_{I_2}$  – объем добавленного раствора иода, мл;  $C_{I_2}$  – концентрация стандартного раствора иода, моль-экв/л;  $V_{Na_2S_2O_3}$  – объем раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование, мл;  $C_{Na_2S_2O_3}$  – концентрация стандартного раствора тиосульфата натрия, моль-экв/л.

Таблица 2

Результаты потенциометрического (иодиметрического) титрования тиамидов I-VIII в водно-этанольной среде (1:1 об.)

	производные тиазола		производное тиазолина	производные 1,3,4-тиадиазола		производные 1,2,4-триазола		производное тетразола
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
$\omega$ , %	72±1.0	100±1.5	80±1.1	88±1.3	94±1.2	90±1.4	85±1.0	118±1.6

Из полученных результатов можно заключить, что соединения II, V и VI могут быть количественно определены методом иодиметрического титрования (табл. 2), а 1-метилтетразолин-5-тион (VIII) подвергается многоэлектронному окислению с образованием сульфоксидов за счет высокой реакционной способности по отношению к активным формам кислорода.

## Протолитические свойства тиамидов

Знание протолитических свойств необходимо как для аналитического изучения сложных равновесных систем (экстракции, комплексообразования и др.), так и для комплексного исследования молекул биологически активных соединений. Процессы всасывания, распределения, метаболизма и экскреции лекарственных препаратов зависят от протолитических свойств. Кроме того, для подбора оптимальных условий идентификации и количественного определения требуется знание констант протолитических равновесий.

Исследуемые тиамиды являются амфолитами и их протолитические свойства количественно характеризуются константами кислотности  $pK_a$  и основности (протонирования)  $pK_{BH^+}$ . Нами определены протолитические свойства тиамидов (I-VIII) потенциометрическим титрованием 0.100 ммоль тиамида (или его сопряженной кислоты) раствором NaOH. Постоянную ионную силу ( $\mu=0.050$ ) поддерживали добавлением к исходному раствору KCl. Значение pH

фиксировалось рН-метром «рН-150М». Расчет констант протолитического равновесия исследуемых соединений проводили методом наименьших квадратов

(МНК) (табл. 3) по уравнению  $\lg \frac{(1-a)C_R - [H^+] + [OH^-]}{aC_R + [H^+] - [OH^-]} = pK_a - \underbrace{pH}_x$ , где  $C_R$  –

аналитическая концентрация титруемого вещества с учетом разбавления в процессе титрования (моль/л);  $a$  – степень оттитрованности, рассчитываемая по формуле  $a = C_{NaOH} V_{NaOH} / \nu$ , где  $C_{NaOH}$  и  $V_{NaOH}$  – концентрация и объем (мл) раствора NaOH,  $\nu$  – количество тиамида (ммоль).

Таблица 3

Значения констант протолитических равновесий тиамидов I-VIII в водно-этанольной среде (1:1 об.),  $\mu=0.050$  (KCl)

	производные тиазола		производное тиазолина	производные 1,3,4-тиадиазола		производные 1,2,4-триазола		производное тетразола
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
$pK_a$	8.50	7.69	>12*	5.69	6.03	7.86	8.88	4.04
$pK_{BH^+}$	2.83	*	2.74	2.78	2.21	2.74	2.71	*

\* - Точное потенциометрическое определение  $pK_a$ (III) и  $pK_{BH^+}$ (II, VIII) невозможно в значениях шкалы рН.

### Исследование связывания тиамидов с бычьим сывороточным альбумином

Распределение лекарственных препаратов в организме зависит от степени их ассоциации с белками плазмы крови (в основном с сывороточным альбумином). Нами определены константы связывания потенциальных тиреостатиков – 2-меркапто-тиазола (I), 2-меркапто-4-фенилтиазола (II), 2-меркапто-тиазолина (III), 2-меркапто-1,3,4-тиадиазола (IV), 2-меркапто-5-метил-1,3,4-тиадиазола (V) – с транспортным протеином, а также число связывающих сайтов молекулы белка методом гашения флуоресценции. В качестве модельной системы выбран бычий сывороточный альбумин, молекула которого представляет собой полипептидную цепь (585 остатков аминокислот), образующую несколько доменов. Раствор альбумина (*Alb*) обладает природной флуоресценцией, обусловленной наличием триптофановых (2) и тирозиновых (20) фрагментов. Связывание альбумина с тиреостатиком сопровождается гашением флуоресценции вследствие образования устойчивого ассоциата белок-препарат. Равновесие ассоциации альбумина с тиреостатиком (*Tr*)  $Alb + nTr = AlbTr_n$  характеризуется константой ассоциации

$K = \frac{[AlbTr_n]}{[Alb][Tr]^n}$ , где  $n$  – число связывающих сайтов молекулы белка.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse при длинах волн облучающего света 280 (возбуждается тирозиновый и триптофановый фрагменты белка) и 295 нм (возбуждается триптофановый фрагмент белка) при постоянной концентрации альбумина ( $1.0 \cdot 10^{-5}$  М) и переменной – препарата. Применяли фосфатный буфер со значением рН 7.37,

близким к физиологическому значению рН крови. Для построения концентрационной зависимости измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны 346 нм.

По степени уменьшения флуоресценции были рассчитаны константа ассоциации белок-препарат и число связывающих сайтов молекулы белка линейным методом наименьших квадратов по уравнению (1). Результаты расчета свидетельствуют об образовании ассоциатов состава 1:1. Для определения равновесной концентрации альбумина  $[Alb]$  вычисляли отношение интенсивности флуоресценции альбумина при определенном соотношении тион:альбумин ( $I_i$ ) к предельному значению интенсивности флуоресценции альбумина в отсутствие тиона ( $I_{пред}$ ):

$$[Alb] = \frac{I_i}{I_{пред}} C_{Alb}; \quad \text{откуда} \quad \frac{I_i}{I_{пред} - I_i} = \frac{1}{K} \cdot \frac{1}{\left( C_{Tr} - C_{Alb} + \frac{I_i}{I_{пред}} C_{Alb} \right)} \quad (1),$$

где  $C_{Alb}$ ,  $C_{Tr}$  – аналитические концентрации альбумина и препарата.

Таблица 4

Результаты определения констант связывания (lgK) тиреостатиков с альбумином методом гашения флуоресценции

Название препарата	lgK
Тиазолин-2-тион (I)	4.91±0.27
4-Фенилтиазолин-2-тион (II)	4.52±0.34
Тиазолидин-2-тион (III)	5.40±0.40
1,3,4-Тиадиазолин-2-тион (IV)	4.65±0.20
5-Метил-1,3,4-тиадиазолин-2-тион (V)	4.75±0.19

Полученные величины lgK (табл. 4) свидетельствуют о достаточно высокой степени сродства потенциальных тиреостатиков по отношению к сывороточному альбумину.

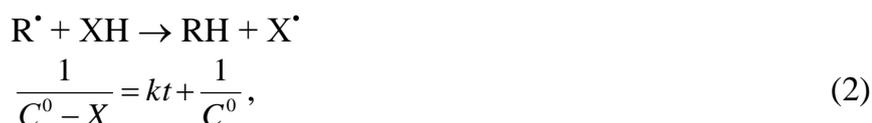
Производные триазола (VI, VII) и тетразола (VIII) не вызывали гашения флуоресценции при длинах волн облучающего света 280 и 295 нм, заметно не проявляя сродства к альбумину.

### **Исследование антиоксидантной активности и определение тиоамидов на основе азотсодержащих пятичленных гетероциклов кинетическим методом**

Гетероароматические тиоамиды как тиреостатики взаимодействуют с активными формами иода (молекулярным иодом,  $I^+$  или  $HOI$ ) и выполняют роль антиоксидантов. Эта “профилактическая” антиоксидантная защита опосредована через систему гормональной регуляции синтеза тироидных гормонов, избыточная концентрация которых приводит к окислительному стрессу.

Нами оценены антиоксидантные свойства гетероароматических тиоамидов I-VIII путем изучения кинетики их взаимодействия с хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом в этанольных, ацетонитрильных растворах и четыреххлористом углероде.

Кинетика взаимодействия хромоген-радикала с тиоамидами I-VIII, взятыми в изомолярных концентрациях, удовлетворительно описывается уравнением реакции второго порядка (2):



где  $C^0$  – исходная концентрация компонентов реакции, М;  $X$  – координата реакции, М;  $t$  – время, мин;  $k$  – константа скорости,  $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

Об антирадикальной активности тиамидов (I-VIII) судили по величине констант скорости реакций второго порядка их взаимодействия с радикалом в четыреххлористом углероде, ацетонитриле, этаноле, которые определяли спектрофотометрическим методом с использованием уравнения (2). Гипохромия длинноволновой полосы поглощения хромоген-радикала в области 517 нм ( $CCl_4$ ,  $\epsilon = 1.17 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), 518 нм ( $C_2H_5OH$ ,  $\epsilon = 7.27 \cdot 10^3 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  в присутствии 10 мМ  $CH_3COOH$ ), 519 нм ( $CH_3CN$ ,  $\epsilon = 1.15 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) свидетельствовала о степени протекании реакции между радикалом и тиамидом. Электронные спектры поглощения в системе 5-меркапто-1-метилтетразол (VIII) – хромоген-радикал представлены на рис. 8.

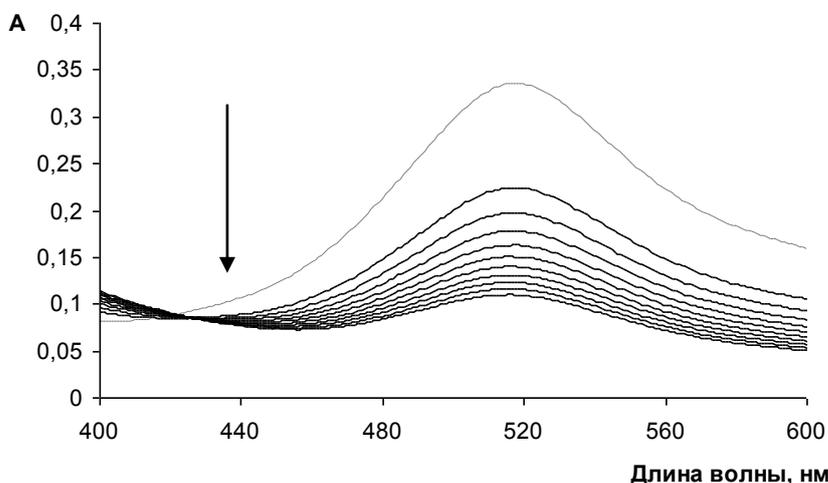


Рисунок 8 – Электронный спектр поглощения 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в этаноле с добавлением 10 мМ  $CH_3COOH$  (пунктирная линия максимального поглощения) и динамика его уменьшения во времени после добавления изомолярного количества 1-метилтетразолин-5-тиона (VIII) ( $4.0 \cdot 10^{-5}$  М) (сплошные линии, проведенные через 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 56; 63; 70 мин после начала реакции).

Результаты спектрофотометрического определения констант скорости взаимодействия тиамидов I-VIII в растворителях представлены в табл. 5.

Таблица 5

Константы скорости реакции препаратов I-VIII с хромоген-радикалом в различных растворителях

Название препарата	Константы скорости реакции, $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ( $\rho \geq 0.99$ )		
	$C_2H_5OH$ (10 мМ $CH_3COOH$ )	$CH_3CN$	$CCl_4$
I	592	$2.50 \cdot 10^4$	$2.01 \cdot 10^3$
II	$1.06 \cdot 10^4$	$4.01 \cdot 10^4$	
III	20	0	*
IV	147	354	223

V	174	377	265
VI	77	$1.05 \cdot 10^3$	*
VII	22	87	*
VIII	380	$3.81 \cdot 10^3$	447

\* - Препараты нерастворимы в  $CCl_4$

Установлено, что кинетика взаимодействия хромоген-радикала с тиаамидами I, IV, VI и VIII при избыточной концентрации 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила описывается уравнением реакции псевдопервого порядка по реагирующим компонентам. Падение светопоглощения хромоген-радикала во времени находится в хорошей корреляции с изменением исходных концентраций тиаамидов в этанольном растворе в присутствии уксусной кислоты (0.04 % об.). Параметры градуировочных графиков ( $Y=b \cdot C+a$ , где  $Y$  – коэффициент линейной регрессии зависимости  $\ln(C_0/C)$  -  $f(t)$ ) и метрологические характеристики методики кинетического определения соединений I, IV, VI и VIII приведены в табл. 6.

Таблица 6

Параметры градуировочных функций и метрологические характеристики определения соединений I, IV, VI и VIII ( $n=5$ ,  $P=0.95$ )

Соединение	Параметры градуировочной функции $Y=b \cdot C+a$			$C \cdot 10^5$ , М	$S_r$	$D$ , %	$C_{min} \cdot 10^7$ , М
	$b \cdot 10^2$	$a \cdot 10^7$	$\rho$				
I	2.77	-0.20	0.994	1.0	0.05	-3.0	7.6
IV	0.15	0.40	0.991	1.0	0.05	2.7	6.9
VI	2.52	-1.0	0.991	1.0	0.04	2.1	7.0
VIII	2.41	2.0	0.995	1.0	0.05	2.5	5.0

Разработанная спектрофотометрическая методика кинетического определения тиаамидов (I, IV, VI, VIII) в этанольных растворах характеризуется хорошей прецизионностью и правильностью результатов.

### Методы хроматографического определения гетероароматических тиаамидов

Хронология представленных в обзоре литературы методов разделения и определения тиаамидов свидетельствует о преобладании в современном фармацевтическом анализе хроматографических методов. Метод капиллярного зонного электрофореза, относящийся к перспективным комбинированным методам разделения и анализа, до настоящего времени не использовался для идентификации и определения тиреостатиков – производных тиазола, тиадиазола, триазола и тетразола.

Нами изучено электрофоретическое поведение тиаамидов на основе пятичленных азотсодержащих гетероциклов (I-VIII) и подобраны оптимальные условия их разделения и определения (боратный буферный раствор,  $pH=9.18$ , напряжение 20 кВ) методом КЗЭ. Определение методом внешнего стандарта проводили, используя систему капиллярного электрофореза «Капель-103Р». Электрофореграмма смеси исследуемых соединений представлена на рис. 9.

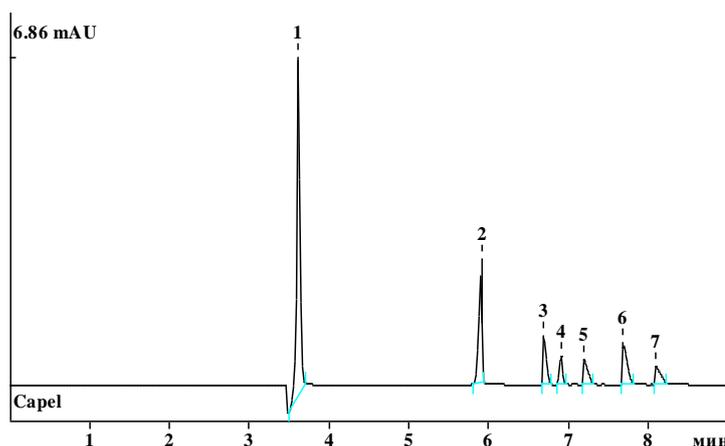


Рисунок 9 – Электрофореграмма смеси соединений I (9.76 мкг/мл), IV (9.84 мкг/мл), V (11.01 мкг/мл), VI (8.42 мкг/мл) и VII (9.59 мкг/мл) на фоне боратного буферного раствора (рН 9.18). 1 – ЭОП; 2 – II; 3 – VII; 4 – V; 5 – I; 6 – VI; 7 – IV.

Результаты электрофоретического определения соединений I-II и IV-VIII представлены в табл. 7. Соединение III выходит вместе с электроосмотическим потоком. Совместное определение соединений IV и VIII невозможно из-за их близкой электрофоретической подвижности. Предлагаемая методика позволяет оценить содержание веществ в диапазонах концентраций 1.17-93.75 (I); 1.93-193.30 (II); 1.18-94.54 (IV); 1.32-105.76 (V); 1.01-101.13 (VI); 1.15-115.16 (VII); 1.16-116.15 (VIII) мкг/мл.

Таблица 7

Метрологические характеристики методики определения соединений I, II, IV-VIII методом капиллярного зонного электрофореза (n=5, P=0.95)

Соединение	$\mu\epsilon \cdot 10^4$	Параметры градуировочного графика $h=a \cdot C+b$			C, мкг/мл	$s_r$	D, %	C <sub>min</sub> , мкг/мл
		a	b	$\rho$				
I	3.23	0.0204	0.0738	0.984	9.38	0.011	-4.1	1.10
II	2.41	0.0616	-0.1290	0.999	11.60	0.011	5.0	0.23
IV	3.49	0.0161	0.0657	0.990	9.45	0.010	2.2	1.11
V	3.01	0.0267	-0.0086	0.999	10.58	0.009	-1.5	1.20
VI	3.34	0.0361	0.0359	0.993	6.06	0.013	1.0	0.96
VII	2.95	0.0384	-0.0515	0.999	6.91	0.013	-1.1	1.01
VIII	3.50	0.0223	0.0078	0.999	6.97	0.009	1.2	1.02

При выборе оптимального состава подвижной фазы (ПФ) объемные соотношения компонентов (ацетатного буферного раствора и ацетонитрила) варьировали от 15:85 до 5:95. Уменьшение объемной доли ацетонитрила в составе ПФ приводило к сильному увеличению времен удерживания препаратов. Для определения методом ВЭЖХ ПФ готовили смешением ацетонитрила и ацетатного буферного раствора с рН 4.70 в объемных отношениях 5:95. Определение методом внешнего стандарта выполняли на жидкостном хроматографе «Хромос ЖХ-301» с детектором «UVV 104М». Использовали колонку размером 150×4.0 мм, заполненную обращенно-фазовым сорбентом Диасфер-110-С18 с размером частиц 5 мкм. Мертвое время колонки составляет 99 с, мертвый объем – 1.32 мл. Скорость подачи подвижной фазы – 1 мл/мин. Детектирование определяемых компонентов проводили в соответствующих максимумах светопоглощения субстанций I (320 нм), IV (305 нм), V (310 нм), VI (260 нм), VII (254 нм), VIII (245 нм).

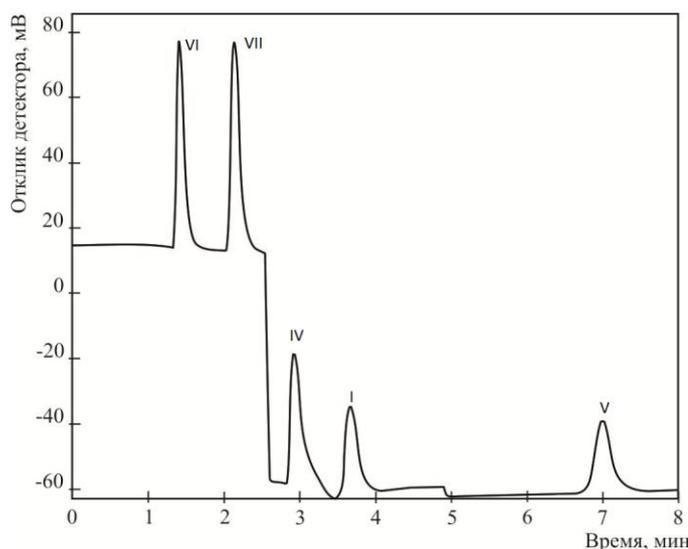


Рисунок 10 – Хроматограмма смеси соединений I (4.69 мкг/мл), IV (4.73 мкг/мл), V (5.29 мкг/мл), VI (4.05 мкг/мл) и VII (4.61 мкг/мл)

Определение тиреостатиков проводили методом внешних стандартов с использованием линейной зависимости высоты пика ( $h$ ) от концентрации определяемого вещества ( $C$ ). Градуировочные функции линейны в широком диапазоне концентраций: 0.47-11.72; 0.47-11.82; 0.53-13.22; 0.40-10.11; 0.46-11.52; 0.46-11.62 мкг/мл соответственно для соединений I, IV-VIII. Времена удерживания ( $t_R$ ), параметры градуировочных графиков ( $h=a \cdot C+b$ ) и метрологические характеристики методики определения приведены в табл. 8.

Таблица 8

Метрологические характеристики методики определения соединений I, IV-VIII методом обращенно-фазовой ВЭЖХ ( $n=5$ ,  $P=0.95$ )

Соединение	$t_R$ , мин	Параметры градуировочного графика $h=a \cdot C+b$			$C$ , мкг/мл	$s_r$	$D$ , %	$C_{min}$ , мкг/мл
		$a$	$b$	$\rho$				
I	3.72	10.2171	-16.9403	0.989	4.69	0.012	-5.0	0.45
IV	2.99	15.3302	-27.5782	0.996	4.73	0.011	4.9	0.43
V	7.03	6.7827	-11.0509	0.995	5.29	0.010	-1.5	0.50
VI	1.42	16.4840	-2.8716	0.997	4.04	0.014	3.3	0.37
VII	2.16	14.4514	-1.9828	0.998	4.61	0.013	5.0	0.41
VIII	1.55	10.0207	-0.2544	0.999	9.29	0.011	5.0	0.42

Соединения II и III являются более гидрофобными в данном ряду азолов, для их определения и разделения ПФ готовили смешением ацетонитрила и ацетатного буферного раствора с рН 4.70 в объемных отношениях 50:50. Хроматографировали при расходе ПФ 1 мл/мин. Детектирование определяемых компонентов проводили в соответствующих максимумах светопоглощения субстанций II (325 нм) и III (275 нм). Для построения градуировочных функций методом внешнего стандарта использовали серию стандартных растворов соединений II и III с концентрациями 1.55-19.33 и 0.95-11.92 мкг/мл соответственно.

Градуировочные функции линейны в широком диапазоне концентраций: 1.55-19.33 и 0.95-11.92 мкг/мл соответственно для соединений II и III. Времена

удерживания ( $t_R$ ), параметры градуировочных графиков ( $h=a \cdot C+b$ ) и метрологические характеристики методики определения приведены в табл. 9.

Таблица 9

Метрологические характеристики методики определения соединений II и III методом обращенно-фазовой ВЭЖХ ( $n=5$ ,  $P=0.95$ )

Соединение	$t_R$ , мин	Параметры градуировочного графика $h=a \cdot C+b$			$s_r$	$D$ , %	$C_{min}$ , МКГ/МЛ
		a	b	$\rho$			
II	3.17	13.3175	-4.7723	0.999	0.017	-4.0	0.34
III	1.66	28.3796	-1.8916	0.999	0.015	-2.5	0.27

Разработанная методика ВЭЖХ определения используемого в медицинской практике препарата III была апробирована при анализе урины. Анализируемый образец урины готовили модификацией свежесобранной урины здорового человека стандартным раствором соединения III в фосфатном буфере ( $pH=6.86$ ). Экстракцию тиреостатика проводили тремя порциями по 5 мл этилацетата (ч.д.а.) из 5 мл урины. Экстракты испаряли при комнатной температуре, растворяли в 5 мл ПФ и анализировали методом ВЭЖХ. При расходе ПФ 1.0-0.6 мл/мин разделить пики матрицы урины и тиреостатика не удалось. При расходе ПФ 0.5 мл/мин хроматограмма образца урины содержит пик (1) соэкстрактов матрицы урины (1.8-3.2 мин) и хорошо сформированный пик (2) препарата III (3.6 мин) (рис. 11). Результаты хроматографического определения тиазолидин-2-тиона в урине представлены в табл. 10. Анализ занимает не более 5 минут, хроматографические пики хорошо сформированы и разделяются до базовой линии (рис. 10).

Таблица 10

Результаты ВЭЖХ-УФ определения содержания тиазолидин-2-тиона в урине ( $n=5$ ,  $P=0.95$ )

Введено, МКГ/МЛ	Найдено, МКГ/МЛ	$D$ , %
3.53	3.37	-4.53
4.41	4.35	-1.36
5.29	5.14	-2.84
7.06	7.34	3.96
8.82	8.96	1.59

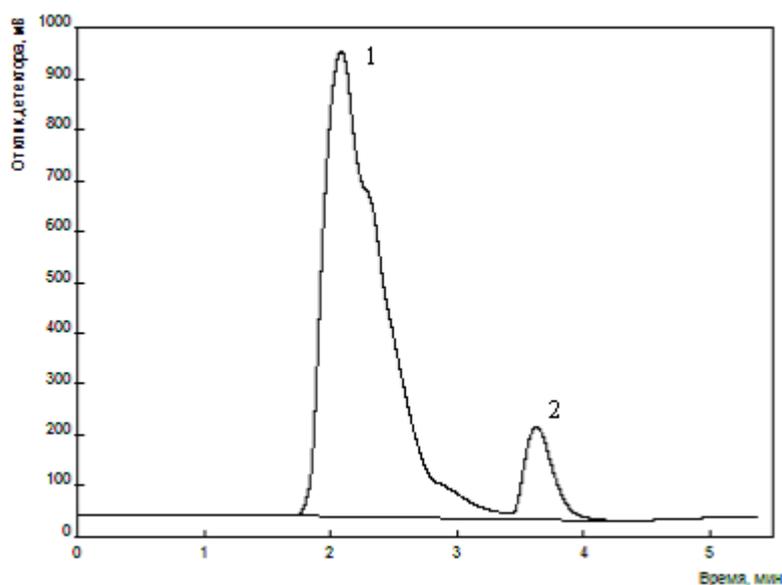


Рисунок 10 - ВЭЖХ-УФ хроматограмма образца урины: тиазолидин-2-тион, 7.06 мкг/мл (2)

## Выводы

1. Исследованы особенности взаимодействия ряда тиамидов на основе тиазола, тиадиазола, триазола и тетразола, обладающих различной способностью координировать молекулярный иод в хлороформе. Решающими факторами, определяющими устойчивость образующихся  $n-\sigma^*$ -комплексов, являются природа гетероцикла и заместителей в его составе, которая уменьшается в ряду VIII>III>VII>V>I $\approx$ II>IV $\approx$ VI.

Изучено взаимодействие тиамидов с элементарным иодом в водно-спиртовых растворах и установлено влияние их структуры на механизм окисления: образование тиильных радикалов, катион-радикалов или иодониевых солей.

2. Установлены молекулярные и кристаллические структуры продуктов взаимодействия соединений V, VI и VIII с элементарным иодом в различных средах. Кристаллическая структура продукта взаимодействия тиона (V) с молекулярным иодом, полученного в хлороформном растворе, образована иодониевыми катионами  $(C_3H_4N_2S_2)_2I^+$  и пентаиодид-анионами  $I_5^-$ , объединенными в цепочки, вытянутые вдоль оси  $c$ , межмолекулярными водородными связями N(4)...H-N(1') и I(1)...H-N(3'). Характерной особенностью кристаллических соединений является образование сдвоенных цепочек за счет различных диполь-дипольных взаимодействий между атомами иода и серы.

3. Определены константы ассоциации молекулярных форм препаратов-тиреостатиков с белком-переносчиком. Ассоциация тиамидов с альбумином реализуется за счет образования водородных связей и гидрофобного взаимодействия. Полученные величины  $lgK$  свидетельствуют о достаточно высокой степени сродства потенциальных тиреостатиков по отношению к сывороточному альбумину.

4. Проведена оценка антиоксидантной активности гетероциклических тиамидов на основе тиазола, тиадиазола, триазола, тетразола по величине константы скорости реакции их взаимодействия с хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом. Установлено, что для реакции псевдопервого порядка скорость реакции линейно зависит от концентраций тиамидов.

Разработана спектрофотометрическая методика кинетического определения гетероароматических тиаамидов с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом.

5. Разработана методика определения тиаамидов I, IV-VIII методом обращенно-фазовой ВЭЖХ при элюировании смесью (5:95) ацетонитрил – ацетатный буферный раствор с рН 4.70. Градуировочные графики линейны в диапазонах 0.47-11.72 (I), 0.47-11.82 (IV), 0.53-13.22 (V), 0.40-10.11 (VI), 0.46-11.52 (VII), 0.46-11.62 (VIII) мкг/мл, пределы обнаружения составляют 0.45; 0.43; 0.50; 0.37; 0.41; 0.42 мкг/мл для соединений I, IV-VIII соответственно.

6. Разработана методика обращенно-фазового ВЭЖХ определения тиаамидов II и III. Градуировочные графики линейны в диапазонах 1.55-19.33 и 0.95-11.92 (III) мкг/мл, пределы обнаружения составляют 0.34 и 0.27 мкг/мл для соединений II и III соответственно. Методика апробирована при анализе образца урины на тиазолидин-2-тион.

7. На основе оценки протолитических свойств тиаамидов установлены оптимальные условия разделения смеси соединений (I, V, VI, VII) и определения соединений (I, II, IV-VIII) методом капиллярного зонного электрофореза. Методика позволяет оценить содержание веществ в диапазонах концентраций 1.17-93.75 (I), 1.93-193.30 (II), 1.18-94.54 (IV), 1.32-105.76 (V), 1.01-101.13 (VI) 1.15-115.16 (VII), 1.16-116.15 (VIII) в мкг/мл, с пределами обнаружения 1.10; 0.23; 1.11; 1.20; 0.96; 1.01; 1.02 мкг/мл для соединений I-VIII соответственно. Методики отличаются хорошей прецизионностью и правильностью результатов, простотой и экспрессностью.

#### Список публикаций по теме диссертации:

1. Черновьянц М.С., **Алешина Н.В.**, Старикова З.А., Сульженко Е.Н. “Изучение взаимодействия 5-метил-1,3,4-тиадиазолин-2-тиона с молекулярным иодом” // Известия Академии наук. Серия химическая. 2010. № 9. С. 1750-1754.
2. Черновьянц М.С., **Алешина Н.В.**, Бурькин И.В. “Хроматографическое и электрофоретическое определение тиаамидов на основе тиазола, 1,3,4-тиадиазола, 1,2,4-триазола, тетразола” // Журнал аналитической химии. 2011. № 3. С. 287-291.
3. **Aleshina N. V.**, Chernov'yants M.S., Shcherbakov I.N. and Starikova Z.A. “Solvent mediated reaction of 1-methyl-1H-tetrazoline-5-thione” // Structural Chemistry. 2011. 22. Pp. 313-317.
4. Черновьянц М.С., **Алешина Н.В.** “Исследование антиоксидантной активности и определение тиаамидов на основе азотсодержащих пятичленных гетероциклов кинетическим методом” // Журнал аналитической химии, 2012. № 3. С. 253-257.
5. Бурькин И.В., **Алешина Н.В.**, Черновьянц М.С. Использование капиллярного электрофореза при определении производных тиазола и тиadiaзола // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды “Экоаналитика-2009”, г. Йошкар-Ола, июнь 2009 г. С. 47.

6. **Алешина Н.В.** Исследование устойчивости комплексов переноса заряда гетероароматических тиоамидов на основе тиазола, тиadiaзола, тетразола с молекулярным иодом // Тезисы докладов IV Международной научно-практической конференции “Наука и современность”, 2010. С. 195-199.
7. **Алешина Н.В.**, Черновьянц М.С. ВЭЖХ-УФ определение тиоамидов на основе тиазола, 1,3,4-тиadiaзола, 1,2,4-триазола // Тезисы докладов Всероссийской конференции “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез”, г. Краснодар, 26 сентября -01 октября 2010 г. С.155.
8. **Алешина Н.В.** Определение протолитических свойств препаратов тиреостатического действия // Тезисы докладов Всероссийской очно-заочной конференции “Современные проблемы естествознания”, 2011. С. 46-48
9. **Алешина Н.В.**, Черновьянц М.С. Исследование антиоксидантных свойств тиоамидов на основе азолов // Тезисы докладов 65-й Итоговой научной конференции молодых учёных РостГМУ с международным участием, г. Ростов-на-Дону, 22 апреля 2011 г. С. 423-424.
10. **Алешина Н.В.** ВЭЖХ разделение и количественное определение препаратов тиреостатического действия // Тезисы докладов XXI Российской молодежной научной конференции “Проблемы теоретической и экспериментальной химии”, г. Екатеринбург, 19-23 апреля 2011 г. С. 225-226.
11. **Алешина Н.В.**, Черновьянц М.С. Кинетическое определение тиоамидов на основе азотсодержащих пятичленных гетероциклов // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды “Экоаналитика-2011”, г. Архангельск, 26 июня-2 июля 2011 г. С. 64.

Алешина Наталия Владимировна

Хроматографическое и спектрофотометрическое определение тиаамидов на основе азолов и анализ продуктов их взаимодействия с молекулярным иодом.

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата хим. наук.

Подписано в печать \_\_\_\_\_ . Заказ № \_\_\_\_\_

Формат 60Ч90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.