



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ”

инж. Борислав Аспарухов Анчев

**СИНТЕЗ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ ПРОИЗВОДНИ НА
L-АСПАРАГИНОВА КИСЕЛИНА С ПОВЪРХНОСТНА
АКТИВНОСТ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност 4.2. Химически науки

(Органична химия)

Научен ръководител: Доц. д-р Даниела Симеонова Цекова

Научно жури:

1. Проф. д-р инж. Емилия Найденова - председател
2. Проф. д-р инж. Любомир Везенков - рецензент
3. Проф. д-р Николай Василев - рецензент
4. Проф. д-р Любка Танчева
5. Доц. д-р Даниела Цекова

София, 2020

Дисертационният труд е написан на 147 страници, съдържа 71 фигури, 13 таблици и 8 схеми. Цитирани са 136 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Органична химия”, състояло се на 22.11.2019 год.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 10.03.2020 год. от 15.00 часа в зала 431 сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

ИЗПОЛЗВАНИ СКЪРАЩЕНИЯ

В дисертацията са използвани трибуквените означения (съкращения) на аминокиселините, възприети от IUPAC

AcOH	Оцетна киселина
AFM	Атомно-силова микроскопия (Atomic force microscopy)
BAM	Brewster Angle Microscopy
Boc	Третичен бутилоксикарбонил
BOP	1H-бензотриазол-1-ил-N-окси трис (диметиламино) фосфониев хексафлуорофосфат
BSA	Bovine serum albumin
CAC	Критична концентрация на агрегиране (critical aggregation concentration)
CMC	Критична концентрация на мицелообразуване (critical micelle concentration)
DCC	N,N' – Дициклохексилкарбодиимид
DIPEA	Диизопропилетиламин
DMF	Диметилформамид
Et ₃ N	Триетиламин
FTIR	Инфрачервена спектrophотометрия с Фурие трансмисия
TBTU	O-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилкарбамид
TLC	Тънкослойна хроматография
TEA	Триетиламин
TFA	Трифлуороцетна киселина
SEM	Сканираща електронна микроскопия
SD	Standard deviation (Стандартно отклонение)
SDS	Натриев додецил сулфат
OBzl	Бензилов естер
MS	Масспектрометрия
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолов бромид

HOBT	1-хидроксибензотриазол
PyBOP	1H-бензотриазол-1-илокситрис(пиролидо)фосфониев хексафлуорофосфат
PBS	Фосфатно буфериран физиологичен разтвор
QAS	Кватернерни амониеви соли
AK	Аминокиселина
AKПAB	Аминокиселинни повърхностно-активни вещества
AKБПAB	Аминокиселинни близначни повърхностно-активни вещества
БПAB	Близначни повърхностно – активни вещества
ПА	Повърхностна активност
ПAB	Повърхностно – активни вещества
ПН	Повърхностно напрежение
ОМ	Оптичен микроскоп
ЯМР	Ядрено-магнитен резонанс
σ [mN.m ⁻¹]	Повърхностно напрежение
σ_{CAC} [mN.m ⁻¹]	Повърхностно напрежение, съответстващо на критичната концентрация на агрегиране

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Повърхностно – активните вещества (ПАВ) са най-произвежданите органични съединения в световен мащаб. Огромната им приложимост във всички отрасли на химическата промишленост и в многобройни направления от нашето ежедневие ги прави сред най-разпространените синтетични вещества. Годишният пазарен дял на ПАВ е \$36 млрд., като се очаква растеж до \$ 41 млрд. през 2022 година. Този дял се генерира от среден производствен обем от 18×10^6 тона/годишно. Наред с тази голямата приложимост и разпространеност на ПАВ се установява, че те имат негативни въздействия върху околната среда. ПАВ се оказват сред основните замърсители на почвите и водите. Стремещът за задоволяване на специфичните условия на приложимост на сърфактантите е причина за синтез на нови, по-устойчиви химични съединения, които да запазват функционалните си характеристики в широки експлоатационни условия. Тези вещества попадат в отпадните води и в резултат от високата си устойчивост към факторите на околната среда не се разграждат, а се акумулират в нея. Тези факти са причина за въвеждането на законодателни регулации в производството на ПАВ. В САЩ и ЕС голяма част от класическите конвенционални сърфактанти, като линейните алкилбензенсулфонати, алкилфенолетоксилати и тетралакиламониени соли са спрени от производство, а употребата им е ограничена.

В наши дни наред с конвенционалните приложения в химическата индустрия ПАВ навлизат все повече и в биомедицината, бихимията, “high-tech” индустриални направления, като нанотехнологии, вектори за пренос на лекарствени форми и генен трансфер. Тези обстоятелства очертават нови концептуални изисквания за структурният дизайн на съвременни ПАВ. Така, към изискванията за висока повърхностна активност и химическа устойчивост в разнообразни експлоатационни условия се прибавят нови изисквания за биоразградимост, биосъвместимост и ниска токсичност. Това налага търсене на нови суровинни сегменти за синтез на ПАВ, които да се вписват в така очертаната рамка. Химиците – синтетици през последното десетилетие са изправени пред решаването на тази задача - дизайн на амфифилни структури с висока повърхностна активност и едновременно с това с много добър профил на биоразградимост и ниска токсичност. Друго важно предизвикателство, определящо съвременният дизайн на ПАВ е получаване на би- и полифункционални сърфактанти.

В съответствие със стратегията 2020 за замяна на минералните - нефтени и въглищни суровинни източници с възобновяеми такива в химията на ПАВ през последните десет години започнаха да се синтезират амфифилни структури от въглехидрати, липиди и аминокиселини. Аминокиселините са градивни единици на белтъците, които пък са структурната основа на живите организми. Поради това, синтезираните от тях продукти се очаква да са биосъвместими. Всяка аминокиселина притежава най-малко две функционални групи, което я прави гъвкав инструмент за амфифилизация чрез естерификация, алкилиране по азотния атом, ацилиране по аминокгрупата или амидиране по карбоксилна група. По тези типови реакции в съвременната ПАВ химия се докладват синтези на нови аминокиселинни сърфактанти, принадлежащи и към четирите основни класа ПАВ. При амфифилизация на аминокиселините с природни мастни киселини, които имат растителен и животински произход като крайни продукти се получават високоефективни, нискотоксични ПАВ с широко приложение в козметичната, хранително-вкусовата, фармацевтичната и биомедицинската индустрия. Тази област от ПАВ – химията концентрира все по-голям научен и индустриален потенциал. Вече са налични промишлени синтетични установки за многотонажно производство на аминокиселинно-базирани ПАВ. Задачата на химиците – синтетици тук е от съществено значение.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Забележка: Номерата на схемите, фигурите и таблиците в автореферата съответстват на тези в дисертацията.

Материалът включен в литературният обзор подчертава необходимостта от създаване на нови съединения с повърхностно-активни свойства на базата на природни градивни единици. Интересът ни беше привлечен от аминокиселините и избрахме L - Аспарагинова киселина (L-Asp), тъй като тя съдържа втора карбоксилна група в молекулата си и на нейна основа няма описани в литературата близки ПАВ. Това определи

целта на настоящата дисертация:

„Синтез и охарактеризиране на нови производни на L - Аспарагинова киселина (L-Asp) с повърхностна активност“.

За постигането на тази цел си поставихме следните задачи:

- 1) Синтез на нови близначни ПАВ производни на L-Asp (Аспарагинова киселина), включващи в молекулата си два еднакви повърхностно активни сегмента. Алифатен мост ще свързва карбоксилните групи на двата L-Asp остатъка, а по аминокрупите им ще се кондензират алифатни киселини.
- 2) Синтез на нови мономерни ПАВ, аналози на близначните, чиято молекула съдържа един L-Asp остатък и два хидрофобни фрагмента. Единият хидрофобен фрагмент е с дължината на моста при близначните, а другия е с варираща дължина, еквивалентен на използваната алифатна киселина.
- 3) Да се определят критичните концентрации на мицелообразуване (СМС) или на образуване на агрегати (САС) във водни разтвори на новите анионоактивни ПАВ.
- 4) Да се изучи поведението на новите ПАВ в условията на компресиране на мономолекулни слоеве на Лангмюир, като се определят π - А изотерми. Да се проведе наблюдение на процеса посредством приложими микроскопски техники – ВАР при компресиране и АФМ – на отложени Лангмюир-Блоджет филми.
- 5) Да се изследват с микроскопски техники (SEM, оптичен микроскоп) прахови образци от новите съединения, както и процеси, свързани с формиране на твърда фаза в разтвор.
- 6) Да се изследват цитотоксичност и антибактериална активност на представители от мономерни и близначни ПАВ.

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУЦИИ

Мотивация и обосновка

В съвременните концептуални изисквания към ПАВ условията за екологичност, ниска токсичност, биосъвместимост и биоразградимост придобиват все по-голяма значимост. Тези изисквания поставят пред химиците - синтетици нелеката задача да получат амфифилни съединения от възобновяеми, природни източници, като освен да се запази и подобри повърхностната активност (ПА) е нужно да се проведе дизайн, гарантиращ тази висока ПА при по-ниски концентрации на влагане в системите.

Интересът ни беше привлечен от АК като суровинен източник за амфифилизация. Хидрофилно – киселите АК притежават допълнителна карбоксилна група в страничната си верига, това ги прави подходящи за получаване на анионактивни ПАВ от тях. Както вече беше споменато анионактивните сърфактанти имат най-голям световен производствен дял и най-широка разпространеност в индустриални и битови приложения. За решаване на дефинираните в дисертацията задачи подходихме към дизайн и синтез на серии ПАВ от хидрофилно-киселата Аспарагинова киселина. От тази АК са публикувани единични статии за синтез на мономерен тип ПАВ. Близначни повърхностно-активни структури от Аспарагинова киселина не са докладвани.

В настоящата дисертация са синтезирани деветнадесет нови, неописани в литературата съединения, като шестнадесет от тях са крайни и три са прекурсори. Получаването на съединенията е проведено по метода на пептидният синтез в разтвор. Приложена е стратегията Вос / Bzl.

По отношение видът на полярния фрагмент новите амфифили принадлежат към два от основните и най-големи класа ПАВ – нейногенноактивни и анионактивни. По структурна принадлежност синтезираните от нас ПАВ се разделят на две серии – мономерни и близначни.

Синтезираните съединения са кодирани както следва: „М“ – обозначава, че серията е мономерна, „А6“ – при α COOH-група на L-Asp са амидно кондензирани шест въглеродни атома. „N_x“ (X = 2, 6, 10, 14) – към N – край на L-Asp са кондензирани остатъци със съответната дължина на веригата. „С“ – посочва, че карбоксилната група от страничната верига на L-Asp е свободна, а „CNa“, че е под формата на натриева сол.

1. Синтез на мономерни ПАВ на базата на L – Asp

Синтезите проведохме в разтвор, по метода на *in situ* кондензация посредством урониево базиран кондензиращ агент TBTU и третична база DIPEA. Като разтворител използвахме DMF. Серията се базира на междинен прекурсор Вос-MA6, който синтезирахме като към С-краят на Вос-Asp(OBzl)-ОН кондензирахме 1-аминохексан, по вече упоменатата техника (Схема 7, реакция I). Получихме продукта с висок добив и го подложихме на деблокиране на Вос-група с TFA (Схема 7, реакция II). Добивите са количествени и реакциите продължихме *in situ*, като кондензирахме към N-краят различни по дължина киселинни остатъци – ацетилов (CH_3CO) за съединение **MA6N2**, капроилов ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CO}$) за съединение **MA6N6**, каприноилов ($\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CO}$) за съединение **MA6N10** и миристоилов ($\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{CO}$) за съединение **MA6N14**, (виж реакционна Схема 7, реакция III). Тук трябва да отбележим, че три от съединенията, описани в дисертацията са получени по два различни метода:

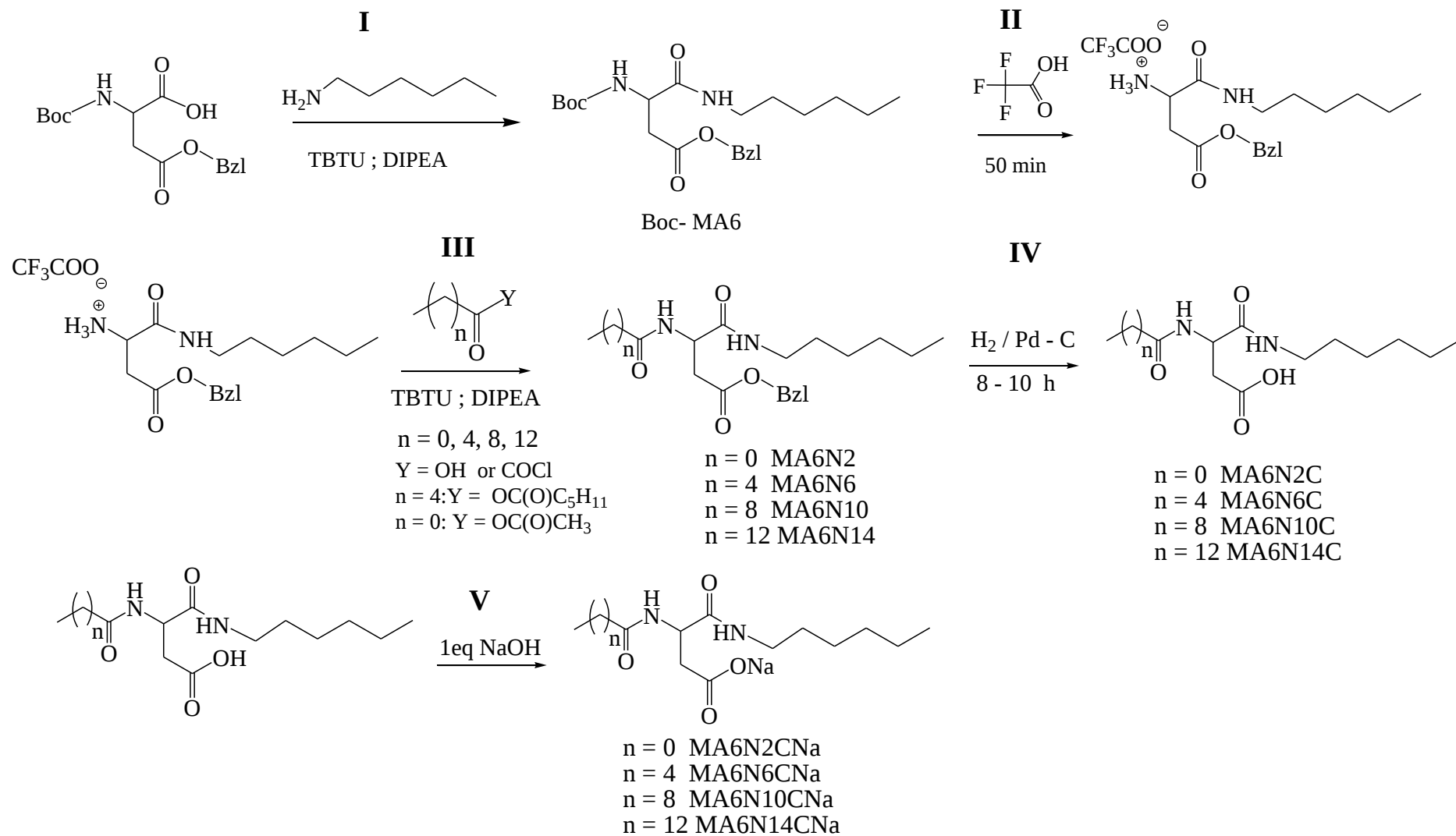
- Приложихме подход с киселинен хлорид за *in situ* кондензиране на хексаноиловият остатък към деблокираният прекурсор - **Вос-MA6**, освен по този метод, същият представител е синтезиран и през анхидрид на хексановата киселина (Схема 7, реакция III ; $\text{Y} = \text{OC}(\text{O})\text{C}_5\text{H}_{11}$; $n = 4$). При първият подход (с киселинен хлорид – Схема 7, реакция III ; $\text{Y} = \text{COCl}$; $n = 4$) срещнахме трудности при изолирането на крайното съединение. Получихме маслообразен продукт, като посредством TLC бяха наблюдавани 3 отделни индикации за съединения с неустановен състав и температурата на топене варираше в широки граници. Продукта прекристализирахме първо из етилацетат – n-хексан, при TLC отново наблюдавахме индикация за замърсяване, установеният добив след тази прекристализация беше 35 %. Подходихме към следваща прекристализация. Разтворихме продукта в етилацетат при кипене и го оставихме при стайна температура за бавна кристализация. Съединението беше изолирано и доказано, но с незадоволителен добив – 22 %. Това ни подтикна да намерим друг, по-добър метод за получаване на този представител. Приложихме кондензация с анхидрид на хексановата киселина. В този случай, при изолиране на крайния продукт се получава твърдо вещество, без индикации за примеси при TLC

анализ, с пренебрежима разлика в точката на топене преди и след прекристализация. Добивът е четирикратно по-висок.

- Друг метод, който приложихме е взаимодействие на прекурсора **Вос-МА6** със съответната мастна киселина в присъствие на кондензиращ агент. По този начин бяха получени представителите с каприноилов и миристоилов фрагмент (Схема 7, реакция III; $Y = OH$; $n = 8, 12$). Тези два представителя са получени и чрез реакция на съответният киселинен хлорид в присъствие на третична база (Схема 7, реакция III; $Y = COCl$; $n = 8, 12$). По-високи добиви се получават при кондензация със съответната мастна киселина.

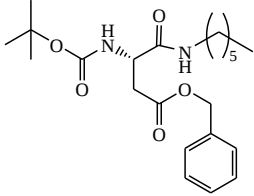
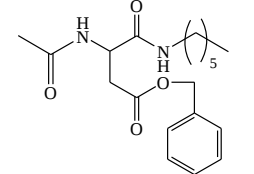
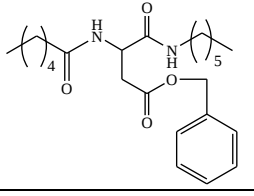
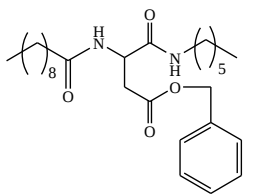
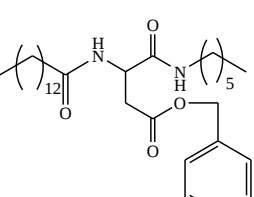
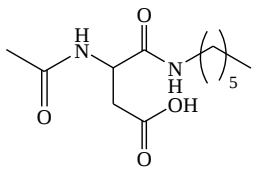
Чрез описаните подходи синтезирахме серия мономерни нейногенактивни ПАВ. Наличието на бензилова естерна защита при страничната карбоксилна група на Asp придава неразтворимост във вода на съединенията. С цел решаване на заложените в дисертацията задачи и получаване на серия анионактивни ПАВ подходихме към деблокиране на защитната група. Този етап извършихме чрез каталитично хидрогениране в среда на метанол и катализатор 5% Pd / C (Схема 7, реакция IV). Добивите са количествени и съединенията са спектрално чисти. По този метод получихме четири анионактивни ПАВ със свободна карбоксилна група – **МА6N2C**, **МА6N6C**, **МА6N10C** и **МА6N14C**. Така получените киселини подложихме на неутрализация с разтвор на натриева основа (Схема 7, реакция V) по методиката, описана в експерименталната част.

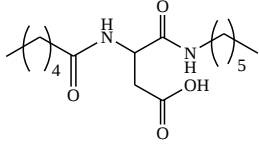
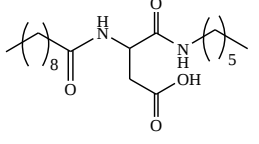
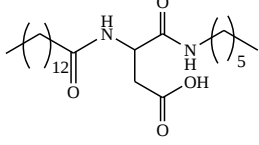
Схема 7: РЕАКЦИОННА СХЕМА ЗА СИНТЕЗ НА МОНОМЕРНИ (ПСЕВДОДВУВЕРИЖНИ) ПАВ НА БАЗАТА НА L – ASP



1.1. Константи на получените продукти

Табл. 3: Някои физични константи на мономерна серия ПАВ

Химична структура	Наименование	Код	T _m , °C	Добив, %	MS (ES) (m/z)	[M + H ⁺]	[α] _D ²⁰
	N-Вос- L- Asp(OBzl)-N ^ε - хексиламид	Вос-МА6	35-37	95	406.52	407.26	-33±2
	Ацетил-L-Asp (OBzl) N- хексиламид	МА6N2	90-91	78	349.20	349.21	-28±2
	Хексаноил-L- Asp (OBzl) N- хексиламид	МА6N6	74	95	405.27	405.28	-30±1
	Деканоил-L- Asp (OBzl) N- хексиламид	МА6N10	85-86	92	461.39	461.34	-27±1
	Тетрадеканоил- L-Asp (OBzl) N- хексиламид	МА6N14	72-74	90	517.39	517.39	-30±5
	Ацетил-L-Asp- N-хексиламид	МА6N2C	118 - 120	90	259.16	259.16	-35±2

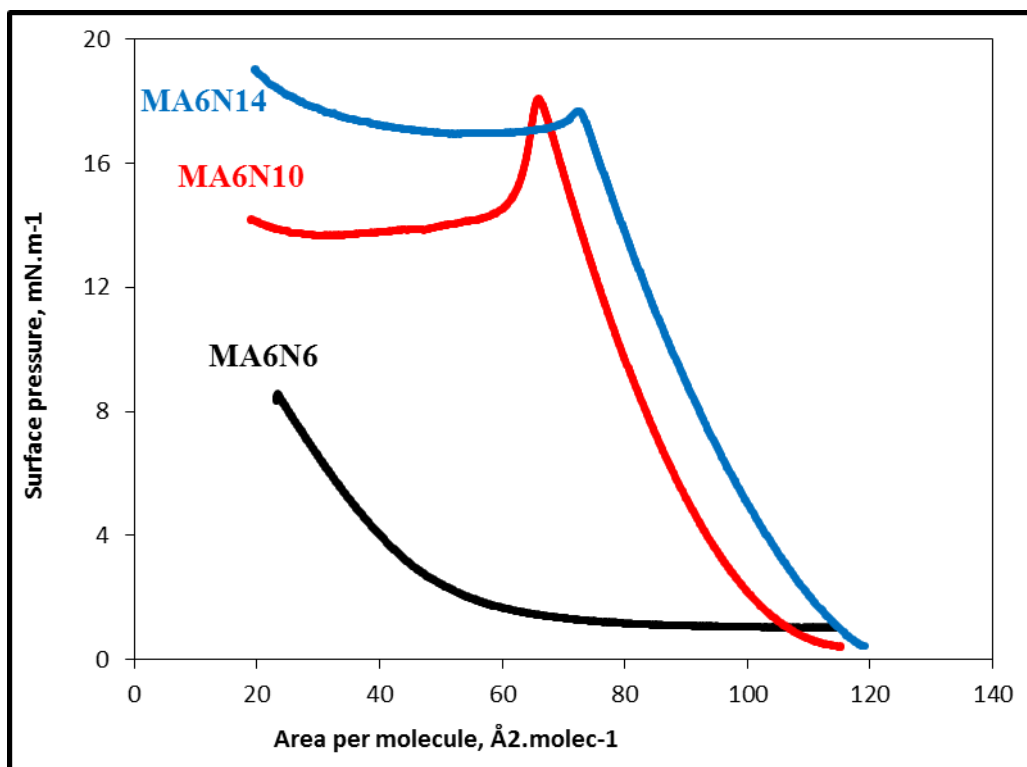
	Хексаноил-L-Asp-N-хексиламид	MA6N6C	66-68	58	315.22	315.22	-39±2
	Деканоил-L-Asp-N-хексиламид	MA6N10C	102-103	94	371.28	371.28	-33±2
	Тетрадеканоил-L-Asp-N-хексиламид	MA6N14C	81-82	70	426.35	426.35	-25±1

Добивите и константите в Табл. 1 са определени след прекристализация из съответният(ните) разтворител(и), упоменати в експерименталната част. Новополучените съединения са доказани със съвременни инструментални техники: ^1H и ^{13}C ЯМР, МАС.

1.2. Мономолекулни слоеве

Синтезираните нейногенактивни съединения (Схема 7, Табл. 3, съединения: **MA6N2**, **MA6N6**, **MA6N10**, **MA6N14**) са неразтворими във вода. За да изучим поведението им на междуфазовата граница вода – въздух изследвахме мономолекулните им слоеве, посредством построяване на π –А изотерми. Съединение **MA6N2** не образува мономолекулен слой, поради тази причина няма изотерма.

На Фиг. 40 са представени π -А изотермите на съединения **MA6N6**, **MA6N10** и **MA6N14**. Изотермите на **MA6N14** и **MA6N10** показват сходно поведение. Наблюдава се аналогия с изотермите на деканова и тетрадеканова киселина [114]. Както се вижда от Фиг. 40 промяната в повърхностното налягане (π) следва хода: В началото π е много ниско, близо до нула, последващо компресиране на монослоя води до бавно нарастване на повърхностното налягане. При стойности от 4 mN.m^{-1} за **MA6N14** и 6 mN.m^{-1} за **MA6N10** π рязко нараства до $\pi = 16 - 18 \text{ mN.m}^{-1}$ със слабо намаляване на площта на молекулата в резултат от процеси на преподреждане в монослоят, най-вероятно се достига до течно-разтегната фаза (LE).



Фиг. 40: π - A изотерми на мономерни, нейоногенактивни ПАВ

При $\pi = 105$ и съответно $90 \text{ \AA}^2$ настъпват някои процеси на препоредждане, които водят до формиране на LC – фаза. Въпреки предположението, че решаваща роля за вида на колапса има взаимодействието между полярните фрагменти на амфифилите и субфазата [111], в нашият случай полярните фрагменти на изследваните съединения са едни и същи, както и субфазата е еднаква, следователно се очаква и еднакъв тип колапс. В литературата са описани два основни вида колапс на мономолекулни слоеве. Когато площта рязко нараства, а повърхностното налягане π се запазва относително непроменено е налице колапсиране при постоянно налягане и в обратният случай - когато π рязко се променя, при относително постоянна площ – колапсиране при постоянна площ. Въпреки наличието на значителен брой статии [111-115], изучаващи процесите на реорганизация по време на колапса, все още не е еднозначно в кои случай кой от двата типа колапс настъпва.

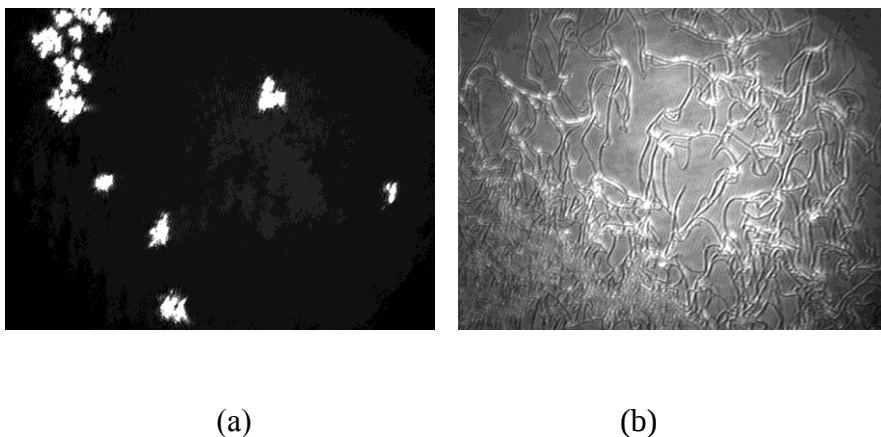
При съединение **MA6N6** компресирането на монослоят дори до площи от $20 \text{ \AA}^2$ не води до значителна промяна в хода на изотермата. Вижда се, че на междофазовата граница настъпват някои процеси на реорганизация. При стойности от $2 - 3 \text{ mN.m}^{-1}$ LE фаза преминава в LC, последващо свиване на монослоя най-вероятно води до процес на преминаване на съединеното в течната субфаза.

Данните, получени от компресиране на мономолекулните слоеве могат да бъдат използвани за определяне на средната площ на молекулата (**ММА** – mean molecular area), която се дефинира като средната площ, заета от една молекула на междуфазовата граница. В точката на колапса може да се определи ММА, след нея монослоят се разрушава и молекулите образуват нова - 3D фаза. Определените от изотермата на Фиг. 40 ММА за съединения **MA6N14** и **MA6N10** са около $80 \text{ \AA}^2$ и $70 \text{ \AA}^2$. Въпреки че и двете съединения имат една и съща хидрофилна група (с една и съща площ), която е потопена във водната фаза, най-вероятно дългите хидрофобни опашки не са разположени перпендикулярно на граничната повърхност, а с лек наклон. Този извод се дължи на факта, че молекулите с по-дълга хидрофобна опашка, **MA6N14**, заемат макар и малко по-голяма, но все пак по-голяма площ (с около $10 \text{ \AA}^2$) от тези на **MA6N10**. Освен това, микроскопски наблюдения върху формирания и компресиран повърхностен слой, показаха наличие на надмолекулни структури, което явно не е без значение за определените с този подход молекулни площи. За да се добие представа за структурата на мономолекулният слой и за доказване наличието на самоорганизиращи агрегати в тях бяха проведени серии експерименти на базата на различни микроскопски техники.

1.3. Изследване на надмолекулни комплекси

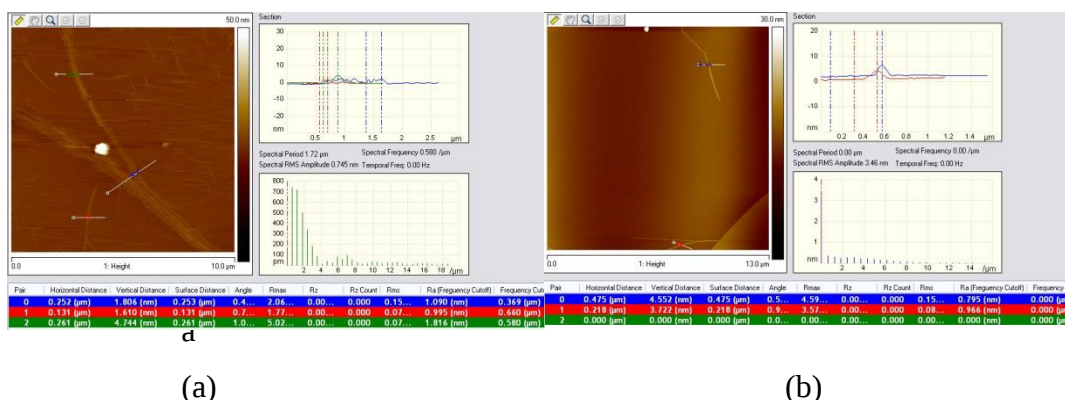
С цел задълбочено изучаване процесите на самоорганизация подходихме в две направления. Първо: наблюдавани бяха 2D мономолекулни слоеве, образувани на междуфазова граница вода – въздух в процеса на формирането им чрез ВАМ техника и пренесени върху твърд носител – чрез АФМ техника. Второ: наблюдавани бяха и образци от твърдите вещества на оптичен микроскоп (ОМ) и SEM (след изпаряване на хлороформ).

ВАМ техника приложихме за наблюдение на 2D мономолекулни слоеве на съединения **MA6N10** и **MA6N14**. При **MA6N10** са забележими агрегати с дължина 50-100 μm , докато при миристиновият представител - **MA6N14** се виждат усукани и сплетени влакна с ширина 1-2 μm и дължина до няколко микрометра, Фиг. 41 (a) и (b).



Фиг. 41: ВАМ (размери: 720x400 μm) – изображение на монослой от
(a) MA6N10 и (b) MA6N14

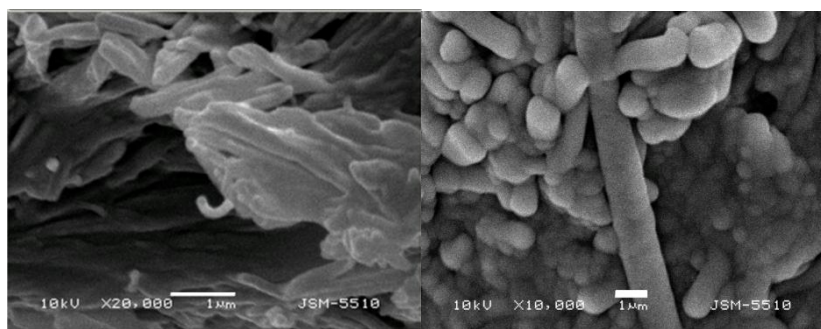
Същите проби, прилагайки **Langmuir-Blodgett** - метода, описан в експерименталната част (т. 4.3) пренесохме върху твърд, неполярен носител (сляда) и наблюдавахме с AFM – техника. Изображенията са поместени на Фиг. 42, (a) и (b).



Фиг. 42: AFM на монослой от (a) MA6N10 и (b) MA6N14

С ВАМ – техника при съединения **MA6N10** наблюдавахме глобуларни агрегати, (Фиг. 41 a), същите агрегати при AFM – се вижда, че всъщност са изградени от много малки и фини фибриларни снопове с хоризонтална ширина от около 2-4 nm и дължина 100 - 200 nm. (Фиг. 42 a). Такъв тип агрегати образува и **MA6N14**, Фиг. 42 (b), но при това съединение се установява, че нишките заснети с ВАМ (Фиг. 41 b), в същност са изградени от много по-малки нишки, чиято ширината е около 4 nm, а дължината 200 – 500 nm.

Прахообразна проба от **MA6N10** и **MA6N14** беше наблюдавана на SEM. Изображенията са представени на Фиг. 43 (a), (b)



(a)

(b)

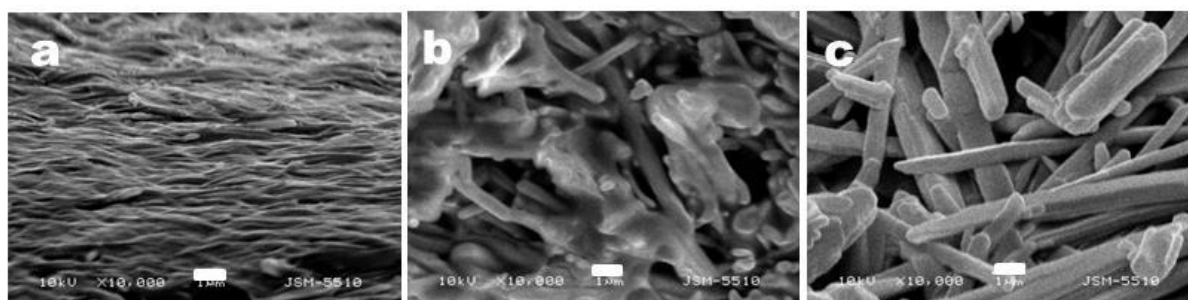
Фиг. 43: SEM изображение на:

(a) MA6N10 ; (b) MA6N14.

Маркерът илюстрира 1 μm

Резултатите от наблюдението отново показват наличие на глобуларни и нишковидни структури.

Прахообразни проби от натриевите соли на съединения MA6N6C, MA6N10C и MA6N14C също бяха обект на SEM – заснемане, Фиг. 44 (a) – (c).



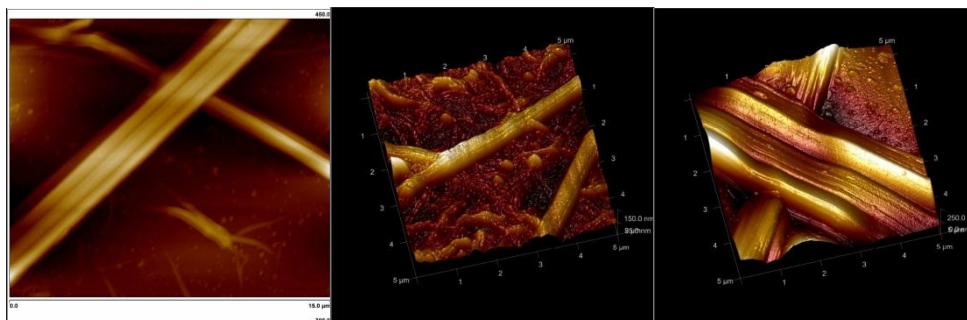
Фиг. 44: SEM изображение на (a) **MA6N6CNa** (b) **MA6N10CNa** (c) **MA6N14CNa**.

След изпаряване на разтворителя. Маркерът илюстрира 1 μm.

От Фиг. 44 се вижда, че натриевите соли проявяват тенденция към формиране на отделни микроразмерни структури, разположени близко една до друга, но с ясно дефинирани граници. При съединение **MA6N6CNa**, Фиг. 44 (a) се забелязват микроразмерни слоеве, разположени от няколко до десет нанометра разстояние един от друг. **MA6N10CNa** Фиг. 44 (b) показва съдържание на смес от добре оформени микроразмерни фибрилари структури и друга – неоформена маса, докато при **MA6N14CNa**, Фиг. 44 (c) се виждат много добре разграничими нишковидни структури, с разстояние по между им от един до няколко десетки микрометра.

С цел по-задълбочено изучаване морфологията и топографията на съединение **MA6N6CNa**, което е единственото от серията хомодвуверижно анионоактивно ПАВ

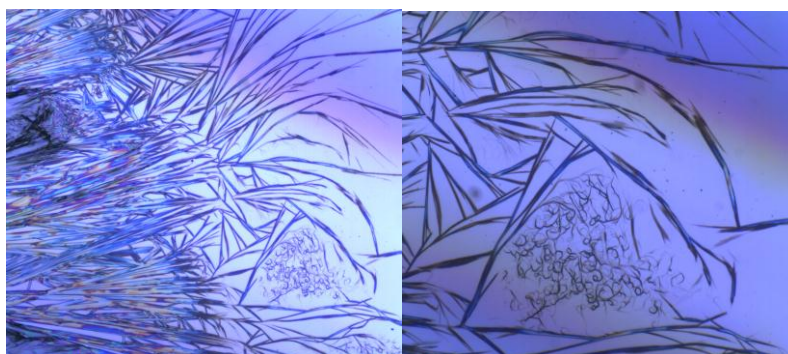
(останалите са хетеродвуверижни) подходихме към AFM – наблюдение на проба от него, получена след изпаряване на капка разтворител, Фиг. 45 (а) – (с)



Фиг. 45: AFM – изображение образец от MA6N6CNa, получен след изпаряване на разтворител.

Фиг. 45 (а) - (с) са заснети на площ от $25 \mu\text{m}^2$. Ясно се виждат добре оформени и засукани един спрямо друг фибриларни комплекси. Отделните нишки са с дебелина от около $15 \mu\text{m}$.

Същата проба от Фиг. 45 е наблюдавана и с оптичен микроскоп, Фиг. 46. Дори с него са забележими тънки, нишковидните самоорганизати.

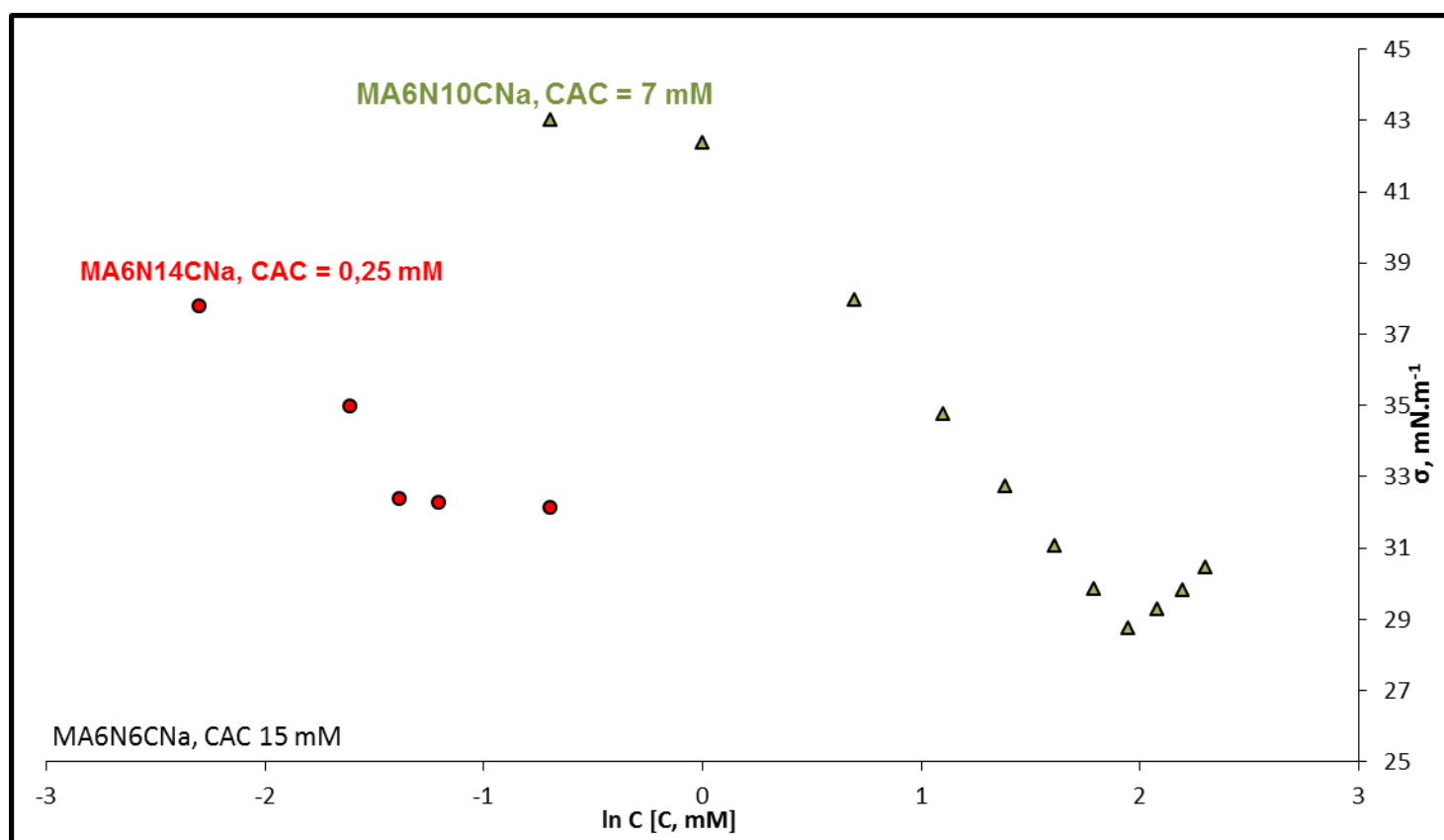


Фиг. 46: Отражателна ОМ на агрегати от MA6N6CNa, наблюдаван след изпарение на разтворителя. (а) $660 \mu\text{m}$; (b) $330 \mu\text{m}$

1.4. Повърхностна активност на мономерна серия ПАВ, синтезирани на базата на L – Asp

След деблокиране на бензиловата естерна защита получихме и доказахме серия съединения, принадлежащи към класа на анионоактивните ПАВ (Схема 7, MA6N2C, MA6N6C, MA6N10C, MA6N14C, Табл. 3). Тъй като за анионоактивните сърфактанти със

свободна карбоксилна група е характерно тяхната ПА да се проявява след превръщането им в съответните карбоксилати [1-9, 11, 23] проведохме неутрализация на получените киселините с разтвор на натриева основа, по методиката поместена в експерименталната част. На така получените карбоксилати определихме САС и ПА чрез снемане на изотермите $\ln C / \sigma$. Графичната зависимост е представена на Фиг. 47. Съединение MA6N2C не проявява повърхностно-активни свойства и поради тази



причина то не е включено в изотермата на Фиг. 47.

Фиг. 47: Зависимост на повърхностното напрежение от $\ln C$ при 22°C.

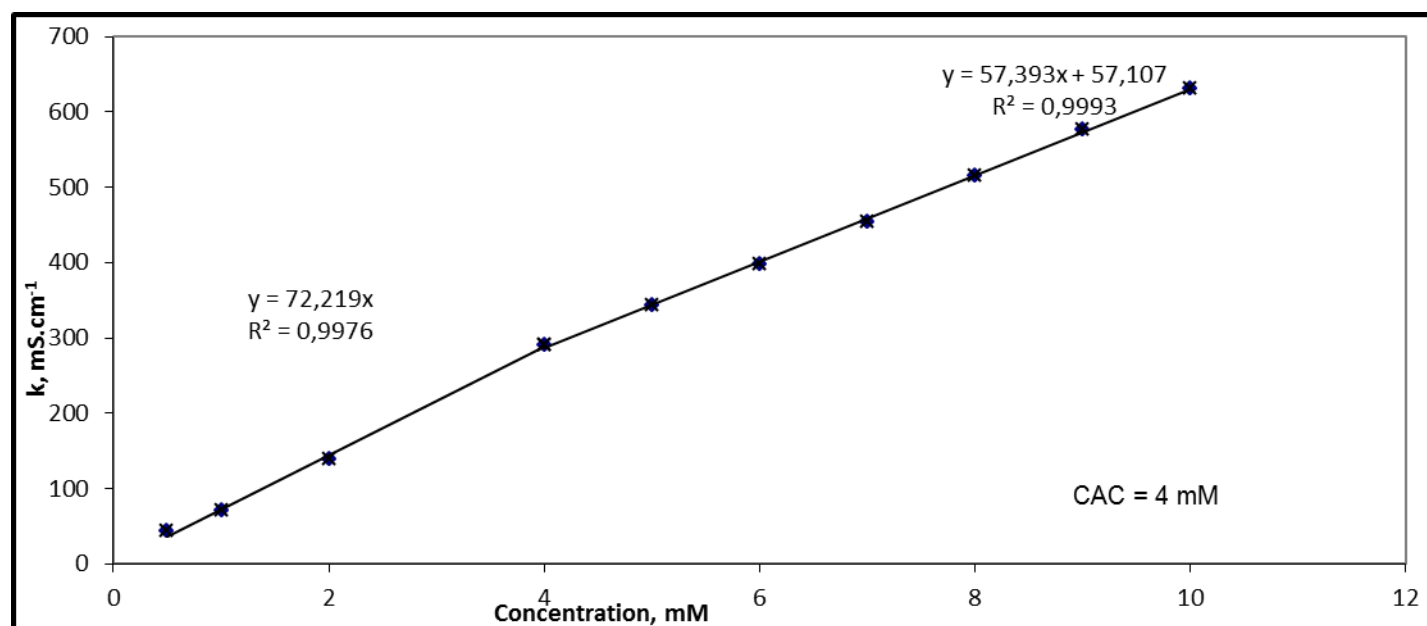
Освен по тензиометричен метод, САС определихме и по кондуктометричния метод, зависимостта на специфичната електропроводимост от концентрацията е поместена на

Фиг.48

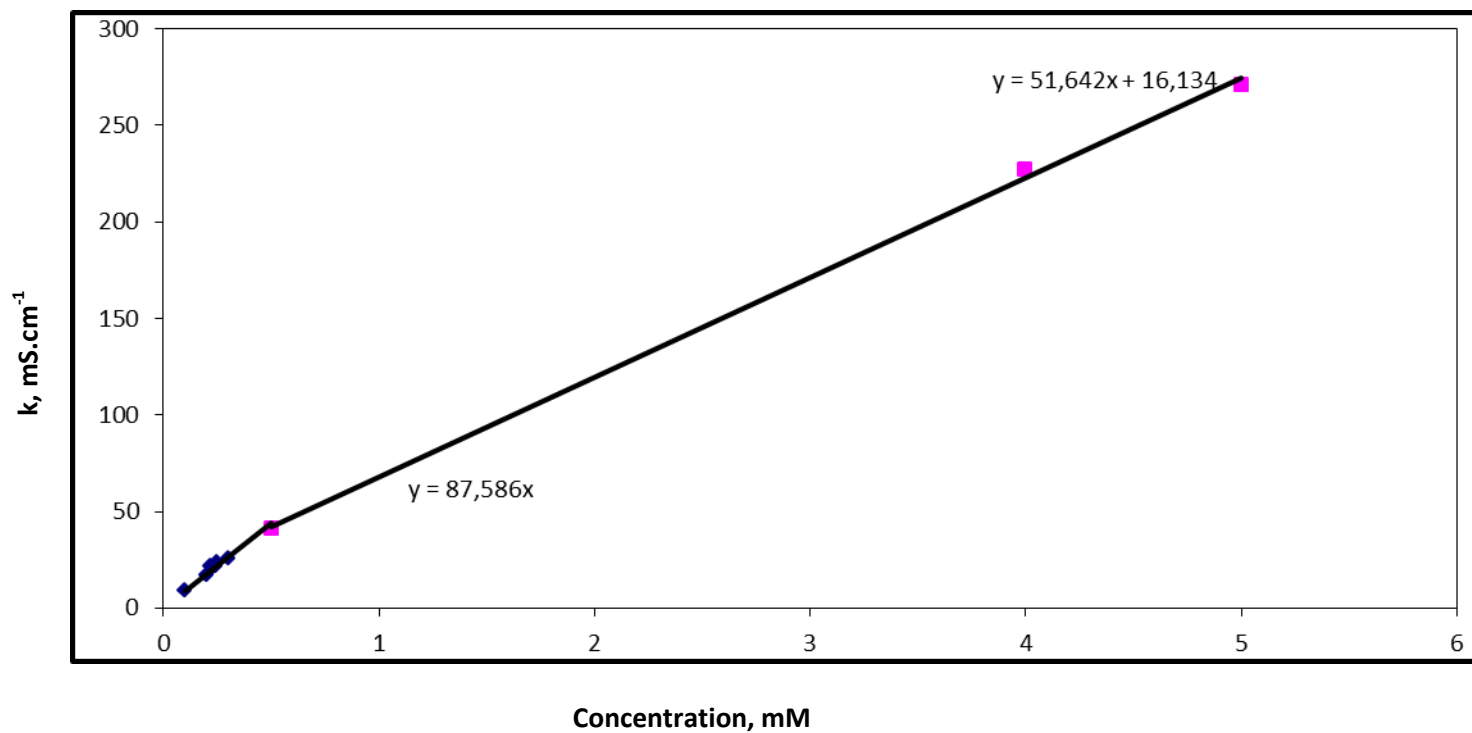
(a)

и

(b).



Фиг. 48 (a): Графична зависимост на специфичната електропроводимост от концентрацията за съединение **MA6N10CNa**



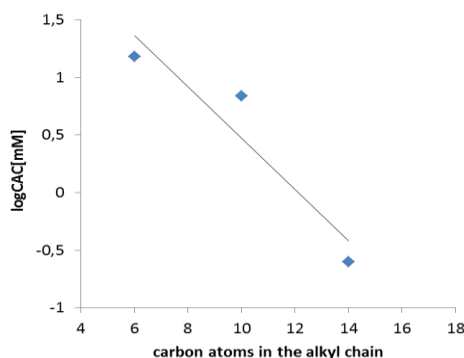
Фиг. 48 (b): Графична зависимост на специфичната електропроводимост от концентрацията за съединение **MA6N14CNa**

В таблица 4 са поместени резултати получени за CAC.

Табл. 4: Критична концентрация на агрегиране, определена по (a) тензиометричен и (b) кодуктометричен метод

Съединение	Брой въглеродни атоми в алифатният фрагмент	CAC		
		(a)		(b)
		mM	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mM
MA6N6CNa	12	15	5.04×10^3	>15
MA6N10CNa	16	7	2.74×10^3	4
MA6N14CNa	20	0.25	112.08	0.5

И по двата метода се получават сходни резултати. Очаквано, с увеличаване дължината на алифатната верига САС намалява. По-добра представа за зависимостта на САС от дължината на веригата дава Фиг. 49:



Фиг. 49: Зависимост на САС от броя C-атоми в алифатната верига

Повърхностното напрежение, измерено в точката на критичната концентрация на агрегиране е сред най-важните характеристики на повърхностно-активните вещества. Съпоставка по този показател, определен по идентичен метод за различни ПАВ дава представа за тяхната ефективност. На таблица 5 е поместено сравнение по показател САС и σ_{CAC} на синтезираните от нас АКПАВ с описаните в литературата анионактивни АКПАВ, както и с някои катионактивни представители. Както беше разгледано в литературния обзор R. Bordes и K. Holmberg [76] докладват синтез на сърфактанти от хидрофилно-кисели АК. Авторите получават: N-додecilаминамалонат, N-додecilаспартат и N-додecilглутамат (ред 8-10 от Табл. 5). Съпоставката на тези ПАВ с полученото от нас със същият брой C-атоми в алифатната част показва, че **MA6N6CNa** (ред 1), редуцира повърхностното напрежение в по-голяма степен при над трикратно по-ниска критична концентрация на агрегиране. Представителят, синтезиран чрез кондензация с деканова киселина - **MA6N10CNa** (ред 2) редуцира ПН до най-ниски стойности, както от собствената си серия, така и в сравнение с останалите

анионоактивни сърфактанти от таблицата. По отношение на натриевата сол на изходната - деканова киселина (ред 5) постигаме 10-кратно намаление в САС и едновременно с това по ниска $\sigma_{\text{САС}}$. Миристиновият представител - **MA6N14CNa** агрегира при най-ниски концентрации в сравнение с другите съединения от серията (ред 3), при него разликата с изходната мастна киселина (ред 7) е най-голяма – приблизително 300 кратно намаление в САС.

Табл. 5: Сравнителна съпоставка: САС - $\sigma_{\text{САС}}$ на синтезирани от нас мономерни ПАВ с литературно налични АК-базирани ПАВ

№	Съединение	Тип на ПАВ	R	САС (mM)	$\sigma_{\text{САС}}$ (mN m ⁻¹)	Източник
1	MA6N6CNa	Анионоактивен	12	15.00	43.5	настоящата дисертация
2	MA6N10CNa	Анионоактивен	16	7.00	28.8	
3	MA6N14CNa	Анионоактивен	20	0.25	31.1	
4	C ₅ H ₁₁ COONa	Анионоактивен	5	730	Конд.	[117]
5	C ₉ H ₁₉ COONa	Анионоактивен	9	74.5	32.6	[118]
6	C ₁₁ H ₂₃ COONa	Анионоактивен	11	20.00	37.5	[116]
7	C ₁₃ H ₂₇ COONa	Анионоактивен	13	6.90	34.5	[119]
8	N-додециламино малонат	Анионоактивен	12	40.00	48.0	[76]
9	N-додецил аспартат	Анионоактивен	12	50.00	48.0	
10	N-додецил глутамат	Анионоактивен	12	50.00	51.0	
11	N-додецил глицин	Анионоактивен	12	10.00	40.0	
12	N-додецил саркозин	Анионоактивен	12	9.50	41.0	
13	N-децил левцин	Анионоактивен	10	3.27	30.5	[61]
14	N-децил пролин	Анионоактивен	10	5.48	33.4	
15	N-децил метионин	Анионоактивен	10	7.57	30.0	
16	N-децил серин	Анионоактивен	10	5.58	32.3	
17	N-деканоил-L-Trp-глицеролетер	Анионоактивен	10	0.36	33.0	[120]
18	N-хексадеканоил-L-Trp-глицеролетер	Анионоактивен	16	0.01	30.0	
19	N-додеканоил-4-хидроксипролин	Анионоактивен	12	2.79	34.2	[79]
20	N-тетрадеканоил-4-хидроксипролин	Анионоактивен	14	0.17	36.2	
21	N-хексадеканоил-4-хидроксипролин	Анионоактивен	16	0.01	36.5	
22	N ^α -децил-аргинин-метилов естер хидрохлорид	Катионоактивен	10	16.00	40.0	[35]
23	N ^α -додецил-аргинин-метилов естер хидрохлорид	Катионоактивен	12	5.80	32.0	
24	N ^α -хексадецил-аргинин-метилов естер хидрохлорид	Катионоактивен	16	2.00	32.0	

R – брой въглеродни атоми в алифатния фрагмент

От описаните анионактивни АКПАВ само при Pro (ред 21) и един Trp (ред 18) – представители са докладвани по-ниски концентрации на агрегиране. Тези сърфактанти, обаче не редуцират ПН σ_{CAC} до стойности под 30 mN m^{-1} , каквито резултати получаваме при представител MA6N10CNa (ред 2). При катионактивните – Arg – представители докладваната критична концентрация на агрегиране (ред 22-24) е с един порядък по-висока от тази, получена при MA6N14CNa.

2. Синтез на Близначни ПАВ на базата на L – Asp

За решаване на поставените задачи в дисертацията и задълбочена съпоставка физикохимичните свойства на мономерна и близначна АК-базирани серии ПАВ подходихме към получаване на нови, неописани в литературата БПАВ на основата на L – Asp. Приложени бяха класическите подходи на пептидният синтез в разтвор, по стратегия и методология аналогична на тази при мономерната серия (виж т.1). Към Boc-Asp(OBzl)-OH кондензирахме 1,6-диаминохексан и получихме висок добив от междинен прекурсор – Boc-A6 (Схема 8, реакция I). За да изследваме по-подробно свойствата на близначните съединения този прекурсор подложихме на деблокане по Boc - група с TFA (Схема 8, реакция II). и изолирахме, пречистихме и доказахме съединение с две свободни amino групи – H-A6.

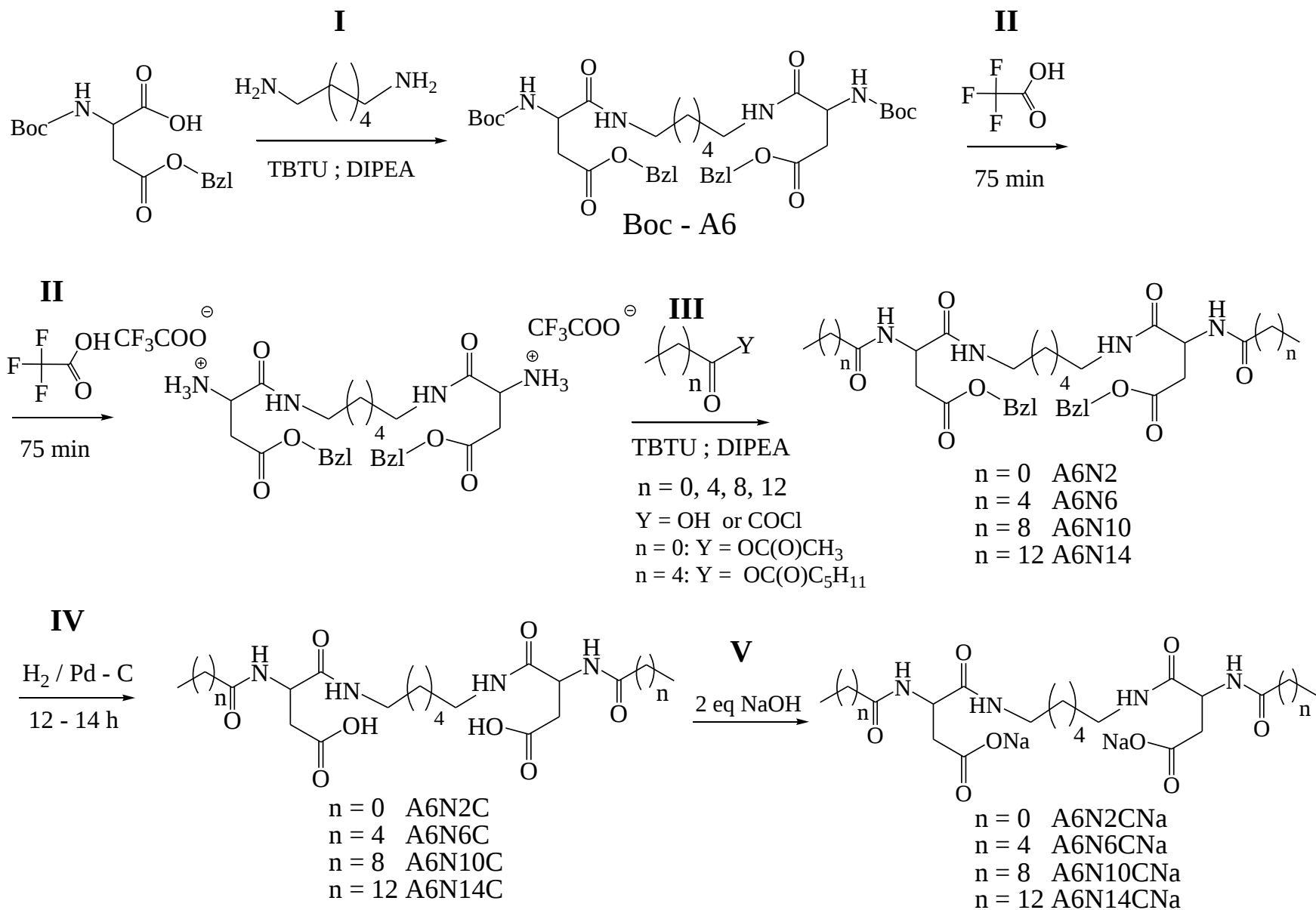
По аналогия от мономерната серия и тук, при близначната синтезирахме четири нейногенактивни (Схема 8, реакция III) и четири анионактивни представителя (Схема 8, реакция IV). Проведохме кондензациите със същите киселинни съединения и близначният прекурсор Boc-A6 (Схема 8, реакция III), при които получихме съединения със следните фрагменти: ацетилов (CH_3CO) за съединение A6N2, капроилов ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CO}$) за съединение A6N6, каприноилов ($\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CO}$) за съединение A6N10 и миристоилов ($\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{CO}$) за съединение A6N14.

Методиките за синтез са подробно описани в експерименталната част от настоящата дисертация. Тук трябва да отбележим, че три от четирите представителя на серията са получени по два различни метода. Съединения A6N6 е синтезирано през хексаноил хлорид в присъствие на третична база (Схема 8, реакция III, $\text{Y} = \text{COCl}$, $n = 4$) и през анхидрид на хексановата киселина (Схема 8, реакция III, $\text{Y} = \text{OC(O)C}_5\text{H}_{11}$, $n = 4$) ; Съединения A6N10 и A6N14 са синтезирани, изхождайки от съответната мастна киселина, в присъствие на третична база и кондензиращ агент TBTU (Схема 8, реакция

III, $Y = OH$; $n = 8, 10$), както от и съответният киселинен хлорид (Схема 8, реакция III, $Y = COCl$, $n = 8, 10$). Най-високи добиви при капринов и миристинов представител получаваме при кондензация с мастна киселина. За капроновият представител добивите са по-високи при реакция на близначният прекурсор Вос-А6 с капроноилов анхидрид, в сравнение с капроноилхлорид.

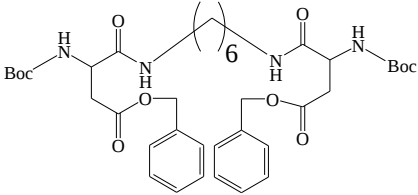
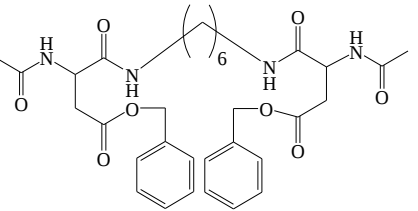
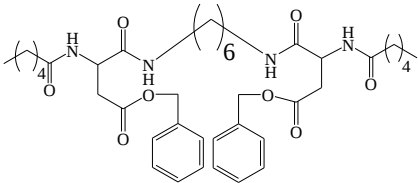
Константите на синтезираните продукти са поместени в табл. 6

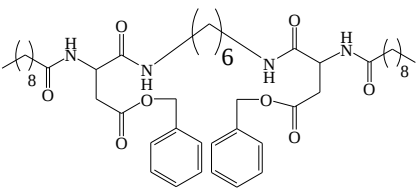
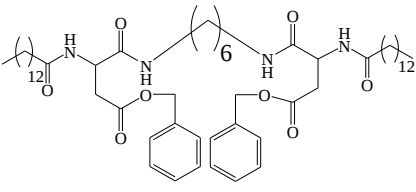
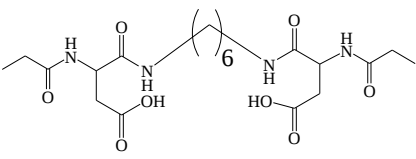
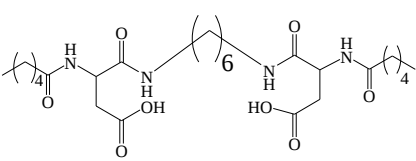
Схема 8: РЕАКЦИОННА СХЕМА ЗА СИНТЕЗ НА БЛИЗНАЧНИ ПАВ НА БАЗАТА НА L – ASP

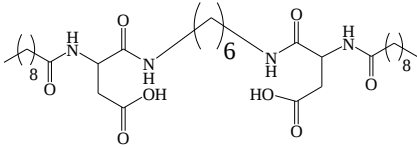
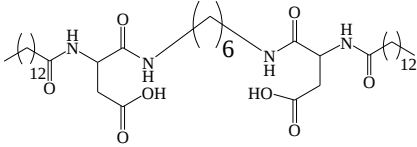


2.1. Константи на получените продукти

Табл. 6: Константи на Близначна серия ПАВ на базата на L – Asp

Химична структура	Наименование по IUPAC	Код	T _г , °C	Добив, %	MS (ES) (m/z)	[M + H ⁺]	[α] _D ²⁰
	N, N' – Бис(N-Вос-L-Аспарагил(О-бензил)) диаминохексан	Вос-A6	129	85	726.80	727.39	+5±1
	N, N' – Бис(N-ацитил-L-аспарагил(О-бензил)) диаминохексан	A6N2	78 – 79	95	610.70	611.32	-44±1
	N, N' – Бис(N-хексаноил-L-аспарагил(О-бензил)) диаминохексан	A6N6	70 – 71	75	722.91	721.35	-36±1

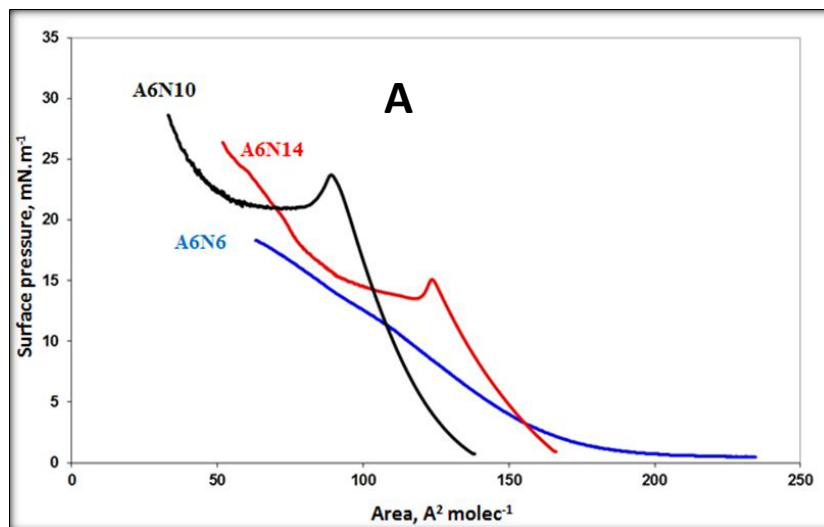
	N, N' – Бис(N-деcanoил-L-аспарагил(О-бензил)) диаминогексан	A6N10	105 – 107	90	835.12	835.13	-33±2
	N, N' – Бис(N-тетрадеcanoил-L-аспарагил(О-бензил)) диаминогексан	A6N14	130	95	947.34	947.69	-29±1
	N, N' – Бис (N-ацетил-L-Аспарагил) диаминогексан	A6N2C	159 – 160	90	430.45	431.21	-35±1
	N, N' – Бис (N-гексаноил-L-Аспарагил) диаминогексан	A6N6C	135 – 136	70	542.67	543.34	-49±1

	N, N' – Бис (N-деcanoил-L-Аспарагил) диаминогексан	A6N10C	144 – 145	90	654.88	655.46	-30±1
	N, N' – Бис (N-тетрадеканоил-L-Аспарагил) диаминогексан	A6N14C	50 – 51	76	767.09	767.59	-35±2

Всички синтезирани съединения са доказани със съвременни инструментални техники - ^1H и ^{13}C ЯМР, МАС, FTIR, като за част от тях е приложен и елементарен анализ. Спектрите са описани в експерименталната част.

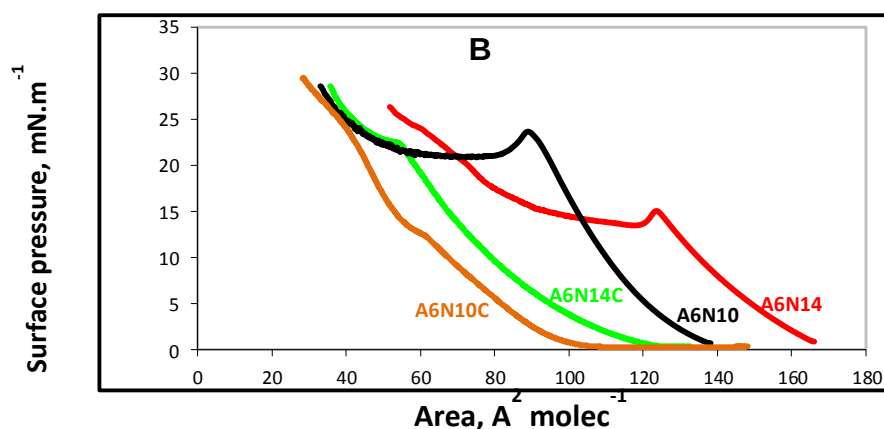
2.2. Мономолекулни слоеве

Както при първата – псевдодвуверижна, мономерна серия ПАВ и тук, при близката (Схема 8, Табл. 6) се снеха π – А изотермите, за да се изучи поведението на синтезираните от нас АКПАВ в при формиране на мономолекулни слоеве.



Фиг. 50 А: π – А изотерми на БАКПАВ съдържащи бензилова естерна защита

На Фиг. 50 (А) и (В) са представени адсорбционните изотерми на Лангмюир, измерени на междуфазовата граница вода – въздух за съединения с бензиолова група (A6N6, A6N10, A6N14 - Фиг. 50 (А)) и техните аналози със свободни карбоксилни групи (A6N10C, A6N14C – Фиг. 50 (В))



Фиг. 50 В: π -А Изотерми на БАКПАВ със свободни карбоксилни групи в съпоставка с аналози с бензилови естерни защиты

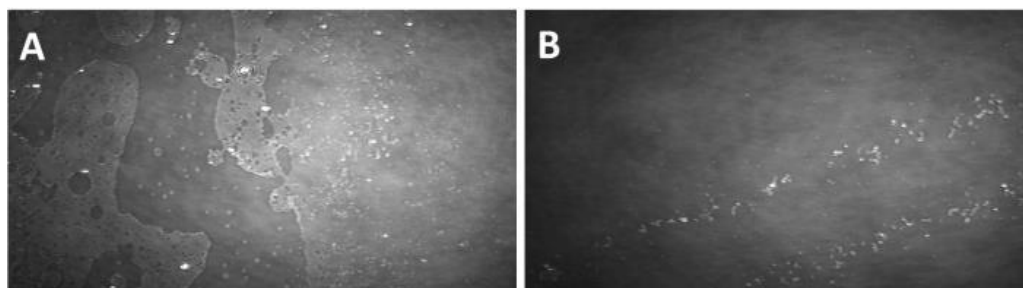
От изотерма, Фиг. 50 (А) се вижда, че при съединение **A6N6** не се достига до колапс. Повърхностното налягане - π в началото има стойности близо до нула. С последващо свиване на монослоя до $2 - 3 \text{ mN.m}^{-1}$ настъпват процеси на реорганизация и мономолекулният слой преминава от течно-разтегнато (LE) в течно-кондензирано (LC) състояние. При по-големи стойности на π **A6N6** преминава от междуфазовата граница в обема. Както очаквахме, съединение **A6N6C**, което съдържа две свободни карбоксилни групи се явява още по-разтворимо в сравнение с **A6N6**. Това е причината да не е представена тази изотерма на Фиг. 50 В

Изотермите на **A6N10** и **A6N14** показват сходен ход, типичен за ПАВ, с намаляване на площта те преминават от LE в LC състояние. Поведението на тези съединения при формиране на мономолекулни слоеве наподобява това на съставляващите ги алифатни фрагменти, съответно - деканова и тетрадеканова киселина. Всички съединения от Фиг. 50 В се намират в LE-фаза, изотермите имат линеен сегмент, различаващ се само по наклона. В началото π е почти нула, с постепенно свиване на подвижната бариера се наблюдава бавно нарастване на повърхностното налягане до стойности от около 5 mN m^{-1} . Изотермите, описващи поведението на мономолекулните слоеве показват сходство със АКПАВ, синтезирани от други автори [111, 120]. Изотермите на съединения **A6N10**, **A6N14**, сравнение с техните аналози, **A6N10C** и **A6N14C**, които съдържат по две свободни карбоксилни групи, вместо бензилови естерни защиты, Фиг. 50В, показват различен ход. Най-вероятно този факт се дължи на разликата в полярните групи, както и на последващото взаимодействие на тези полярни групи със субфазата. Освен това, съединенията с бензилова група имат значително по-голяма площ на молекулата в сравнение с киселинните си аналози. Някои от нашите предварителни изследвания показват, че бензиловите групи не са перпендикулярни на междуфазовата граница, а по-скоро лежат на страни. Някои автори [111] смятат, че различните типове колапс се проявяват в зависимост от взаимодействието на полярните части със субфазата. В други източници [122] 2D - 3D трансформацията на мономолекулният слой се описва с промяна степента на дисоциация на полярните групи. Е. Hatta и съавтори [114] предполагат, че и двата фактора имат значимост за вида на колапса. Все още в литературата не е посочено еднозначно в кои случаи какъв тип колапсиране се наблюдава. Данните, получени от компресиране на мономолекулните слоеве използваме за определяне на средната площ на молекулата (ММА) в точката на колапса. От Фиг. 50 (В) се вижда, че ММА при съединенията с бензилови естерни

защити е значително по-голяма, в сравнение с тези със свободни карбоксилни групи. При съединение **A6N14** MMA е $125 \text{ \AA}^2$, докато при карбоксилният аналог е $60 \text{ \AA}^2$. Сходна е ситуацията с **A6N10**, който има MMA $95 \text{ \AA}^2$, а **A6N10C** – $60 \text{ \AA}^2$. Въпреки, че двете двойки съединения - **A6N14** и **A6N14C**, както и **A6N10** и **A6N10C** се различават по една и съща част от молекулата (наличие или отсъствие на бензилова естерна защита) разликите в средната молекулна площ не са еднакви и са съответно 55 и $30 \text{ \AA}^2$. И тук, като най-приемливо изглежда обяснението с образуване на самоорганизирани полимолекулни структури, което всъщност, се оказва интересен феномен. Изследването му с помощта на различни типове микроскопи е представено в следващата точка.

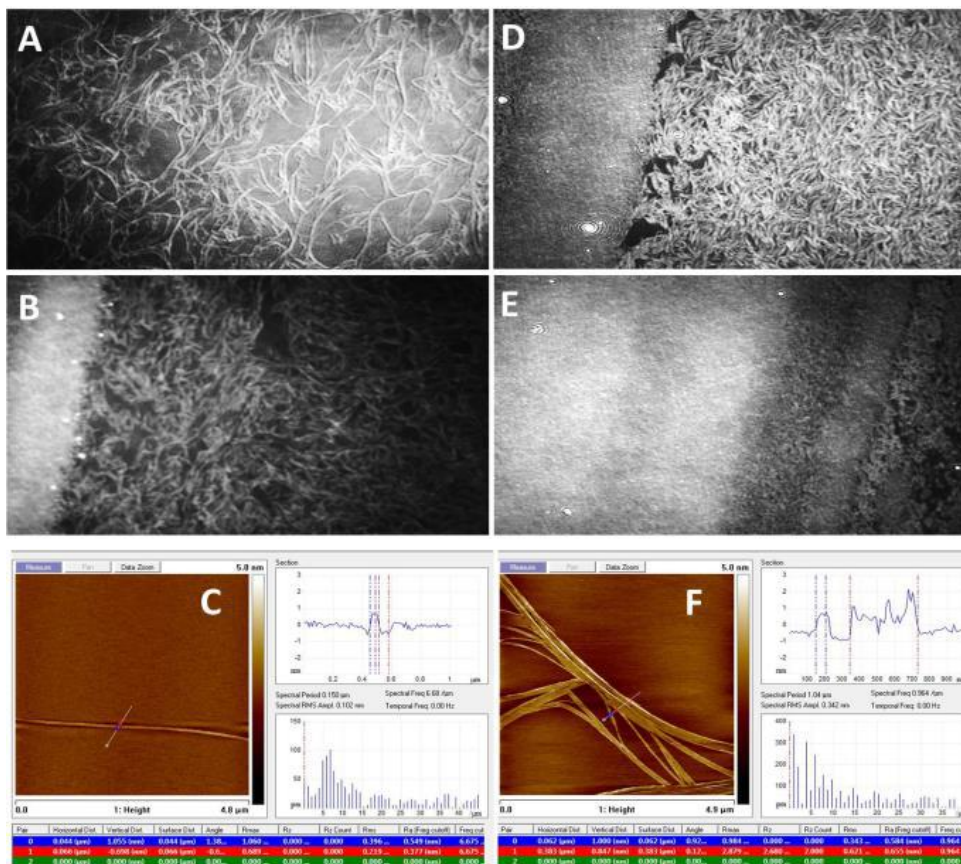
2.3.Изследване на надмолекулни комплекси

На Фиг. 51 са представени ВАМ – изображения на монослоеве, получени от съединения **A6N6**. При този представител първоначалните агрегати най-вероятно се образуват по време на изпаряване на повърхностния слой разтворител от междуфазовата граница вода – въздух. В началото на компресията, при $\pi = 2 \text{ mN.m}^{-1}$ се наблюдават малки, разпръснати 2D-сферични образувания с диаметър по-малък от $10 \mu\text{m}$, както и малки островчета. При движение на бариерата в посока намаляване на площта тези малки островчета се сливат и обединяват в по-големи, докато се образува непрекъснат филм.



Фиг. 51 – ВАМ изображение на мономолекулен слой,
формиран от съединение **A6N6** (размери: $720 \times 400 \mu\text{m}$)
А) в началото на компресията, $\pi = 2 \text{ mN.m}^{-1}$ и В) $\pi = 18 \text{ mN.m}^{-1}$

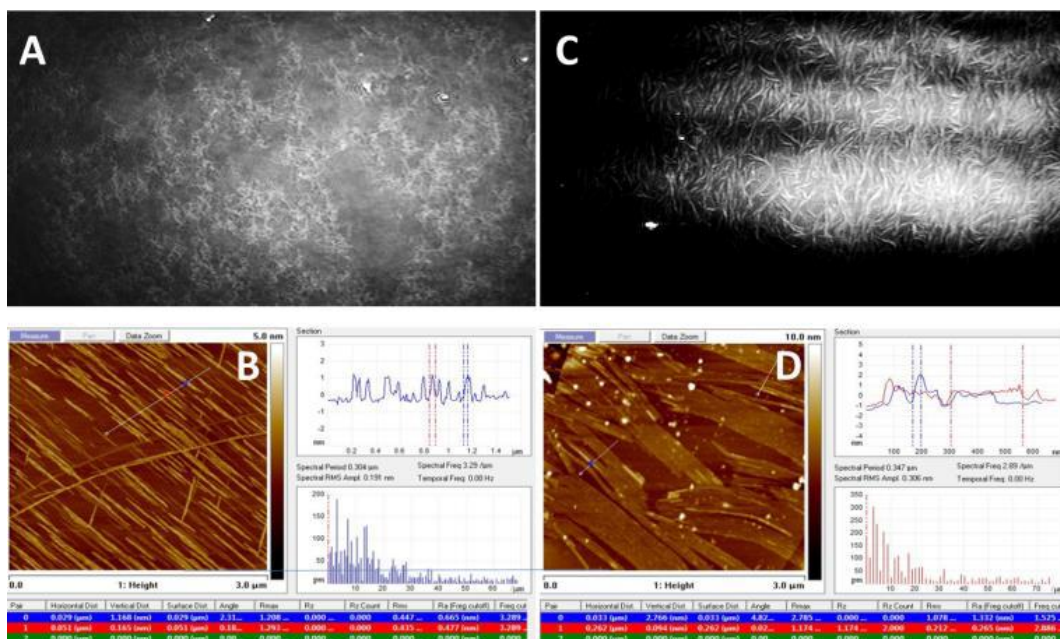
На Фиг. 51 (B) е заснета, когато площта е свита до налягане $\pi = 18 \text{ mN.m}^{-1}$. Тук се вижда еднороден филм и сферични агрегати, подредени в линии.



Фиг. 52: A, B, D, E – ВМ изображение на мономолекулен слой, формиран от съединение **A6N10** (размери: 720x400 μm) и съответно C, F – АФМ върху слюда. Преди колапс (A. – C.): A. $\pi = 15 \text{ mN.m}^{-1}$; B. $\pi = 22 \text{ mN.m}^{-1}$; C. $\pi = 15 \text{ mN.m}^{-1}$ в началото на компресията, $\pi = 2 \text{ mN m}^{-1}$ и B) $\pi=18 \text{ mN m}^{-1}$. След колапс (D. – F.): D. $\pi = 22 \text{ mN.m}^{-1}$; E. $\pi = 26 \text{ mN.m}^{-1}$; F. $\pi = 22 \text{ mN.m}^{-1}$.

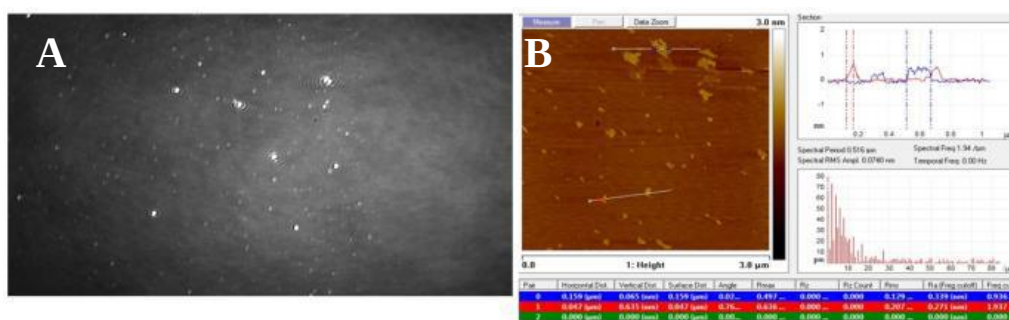
При съединение **A6N10** изследвахме образуването на надмолекулни комплекси, след изпаряването на разтворителя на различни етапи от свиването на подвижната бариера, Фиг. 52 (A-E). Тук се наблюдават усукани нишки с дължина от няколко стотин микрона и ширина от няколко микрона. Свиването с бариерата предизвиква впримчване на нишките една в друга и в резултат от това структурата на филма придобива по-голяма компактност.

В точката на колапса филма е с най-голяма плътност.



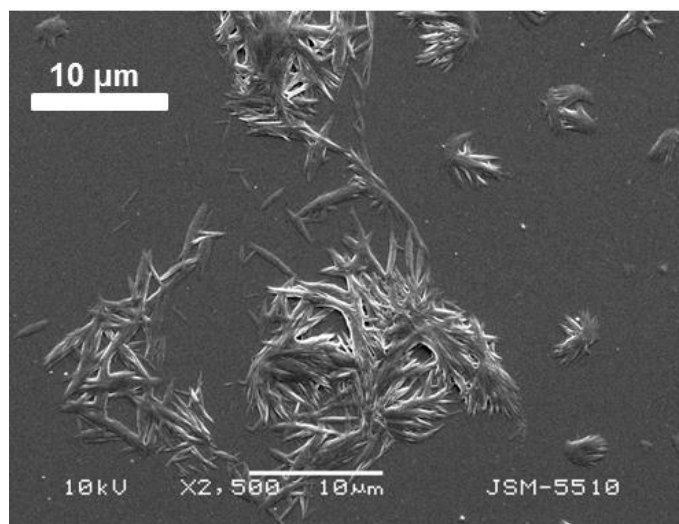
Фиг. 53: (A) BAM (размери: 720x400 μm) и (B) AFM изображения на съединение **A6N14** преди колапс, $\pi = 13 \text{ mN.m}^{-1}$; C – BAM и D – AFM, след колапс, $\pi = 27 \text{ mN.m}^{-1}$

Аналогично поведение на A6N10 показва и съединение A6N14, Фиг. 53. В условията на компресия се формират подобен тип нишки със сходни размери. Впечатление прави, че при увеличаване на компресията (свиване на подвижната бариера) нишките се събират и подреждат успоредно на оста си, като в крайна сметка се наслагват една върху друга (Фиг. 53 D)



Фиг. 54: A) BAM (размери: 720x400 μm) и B) AFM изображение на съединение **A6N14C**

При **A6N14C** от BAM изображението се виждат само отделни глобуларни структури, Фиг. 54 A, същите структури наблюдавахме и с AFM, Фиг. 54 B. За да направим сравнение на агрегатите, формирани от различните структурни аналози със и без бензилова естерна група поставихме капчица от хлороформен разтвор на съединение **A6N14** върху стъклена повърхност и след изпаряване на разтворителя го заснехме на SEM – Фиг. 55

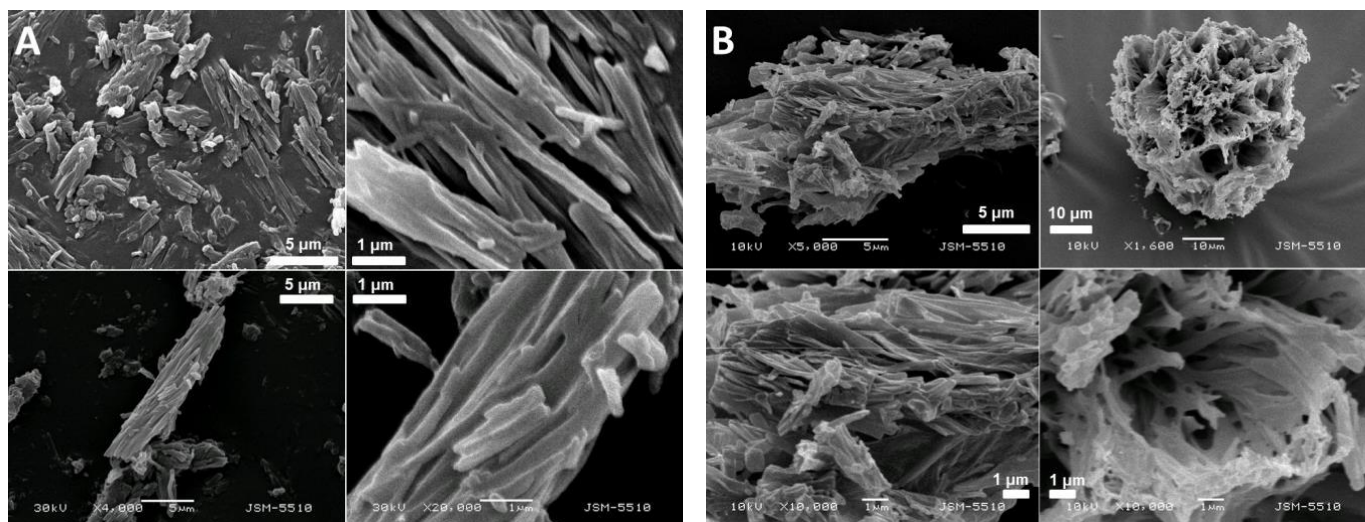


Фиг. 55: SEM изображение на **A6N14** върху стъклена повърхност, след изпарение на хлороформ.

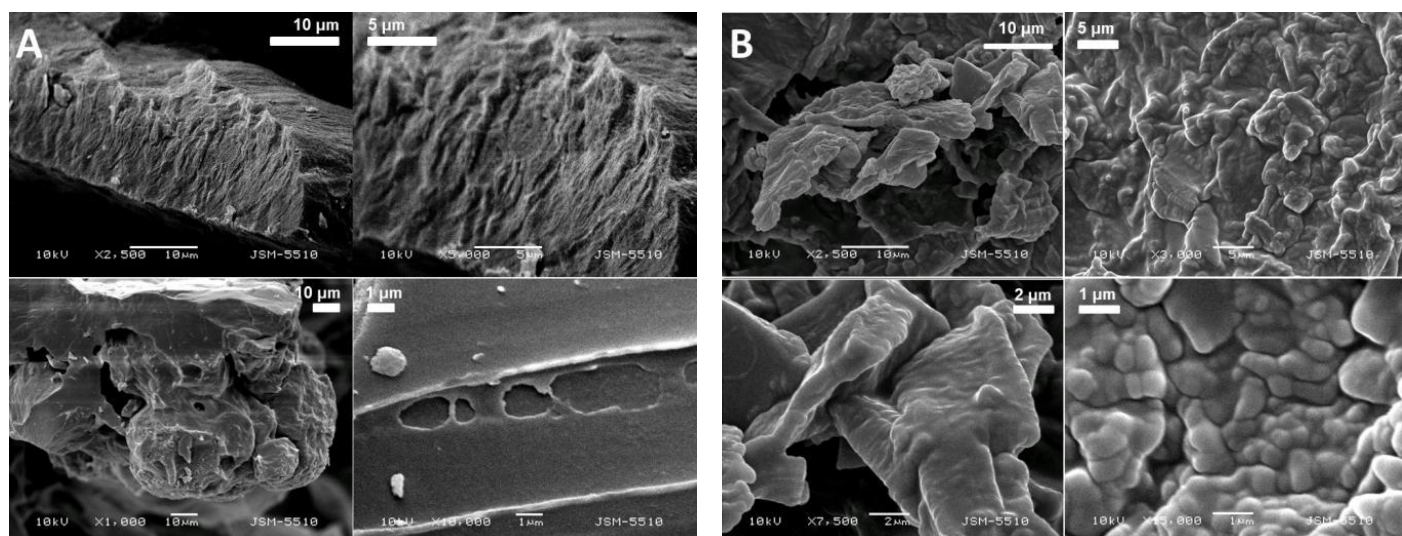
На снимката се виждат отново фибриларни структури, но за разлика от тези, заснети условията на формиране на мономолекулни слоеве, където имаме извити и по-дълги нишки (Фиг. 53), тук структурите са по-къси и почти прави. От двата експеримента можем да заключим, че вида и формата на структурите зависи от носителя (субфазата), върху който се наблюдават, както и от условията, при които се формират. При AFM монослоеве са прехвърлени (по метода на Langmuir-Blodgett) върху носител - слюда, докато при SEM изображенията – стъклена повърхност. Снимките от електронен микроскоп показват някои различия в мирко- и наноструктурите в зависимост от начина, по който са подготвени образците.

При съпоставка на структури на **A6N10** и **A6N14**, предварително разтворени в хлороформ (Фиг. 55) с твърдата форма (не разтворени) на същите съединения - (Фиг. 56 – А, В – по-долу), както и с техните аналози със свободни карбоксилни групи - **A6N10C** и **A6N14C** (Фиг. 57, А, В) и тези под формата натриевите соли на техните карбоксилни аналози **A6N10CNa** и **A6N14CNa** (Фиг. 58, А, В) се вижда, че във всички случаи структурите на съединенията са съставени от много тънки нишковидни

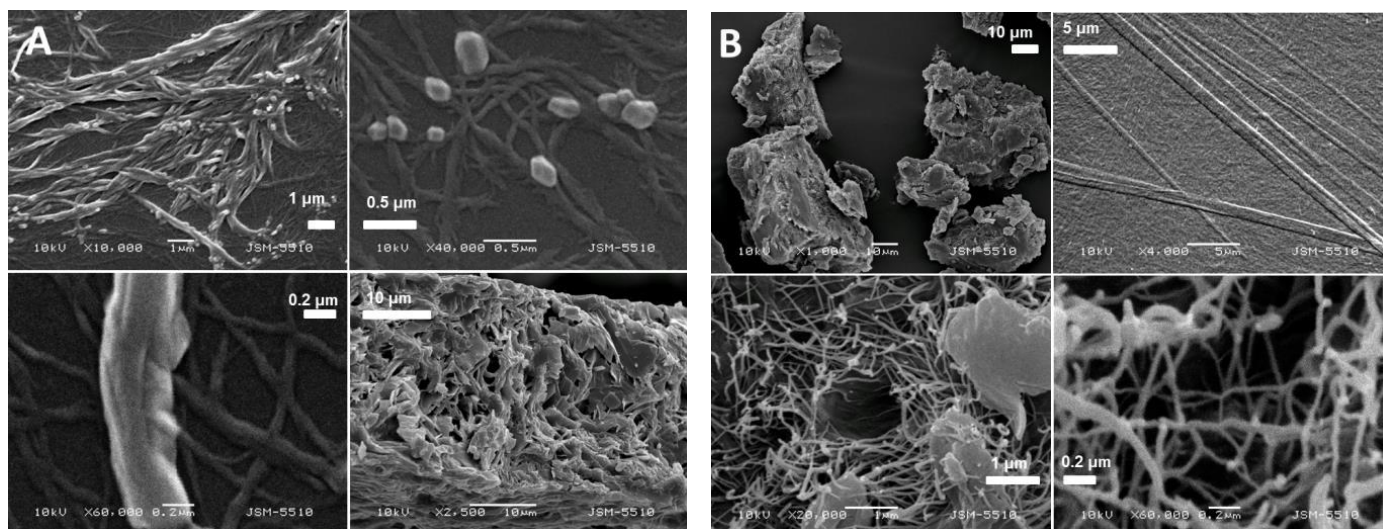
образувания, прилепнали една към друга и образуващи порести структури.



Фиг. 56: SEM изображения на твърда форма (частица) от съединение: **A6N10** (A) и съединение **A6N14** (B)



Фиг. 57: SEM изображения на твърда форма (частица) от съединение: **A6N10C** (A) и съединение **A6N14C** (B)



Фиг. 58: SEM изображение на твърди частици от натриеви соли

A6N10CNa (A) и A6N14CNa (B)

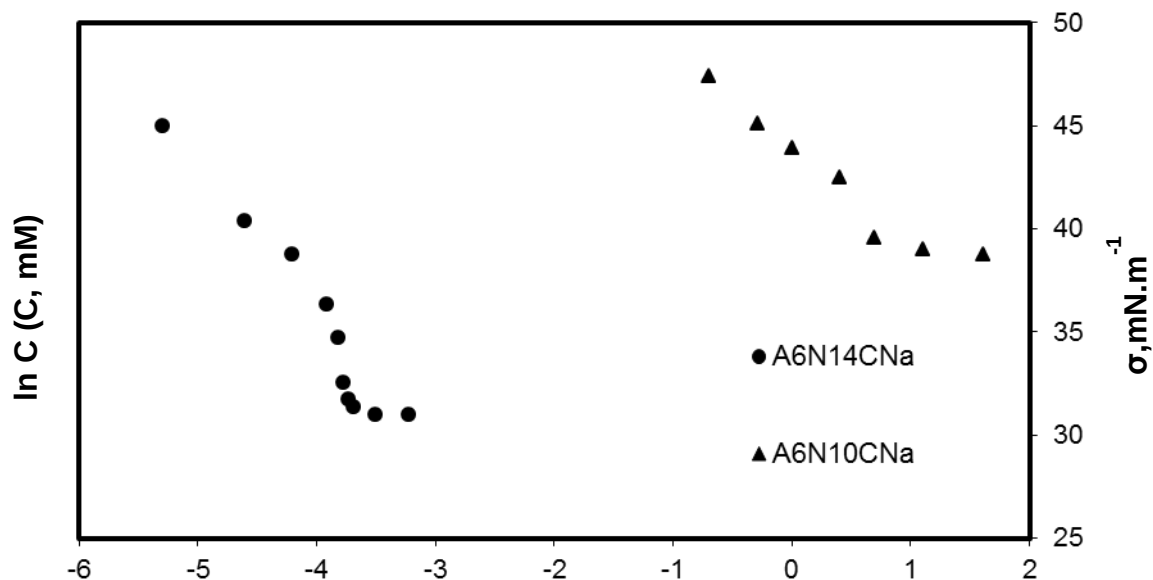
Очевидно при високо пресищане веществото кондензира в твърда фаза и образува структури с фибриларен профил. Оставащият наситен разтвор съдържа отделни молекули от съединението, които образуват тънък слой около кондензираната частичка, типичен за ПАВ. Ето защо при получените SEM-изображения се наблюдават фини фибри или слоеве във вътрешността на частичката и задно с това - гладка повърхност.

2.4. Повърхностна активност на близначна серия ПАВ, синтезирани на базата на L – Asp.

За да съпоставим повърхностно-активните свойства на мономерната серия ПАВ (Схема 7, Табл. 5) със свойствата на близначната серия (Схема 8, табл. 6) по метода на каталитичното дехидрогениране проведохме деблокиране на безниловите естерни защиты на нейногенактивните съединения – **A6N2**, **A6N6**, **A6N10** и **A6N14** и получихме техните аналози със свободни карбоксилни групи - **A6N2C**, **A6N6C**, **A6N10C** и **A6N14C**. Както вече беше дискутирано в т. 1.4. за анионактивните ПАВ със свободни карбоксилни групи е характерно ПА да се определя на техните метални соли. По тази причина проведохме неутрализация на получените киселини с разтвор на натриева основа и получихме съединения - **A6N2CNa**, **A6N6CNa**, **A6N10CNa** и **A6N14CNa**. Обект на тензиометричните и кондуктометричните изследвания бяха тези

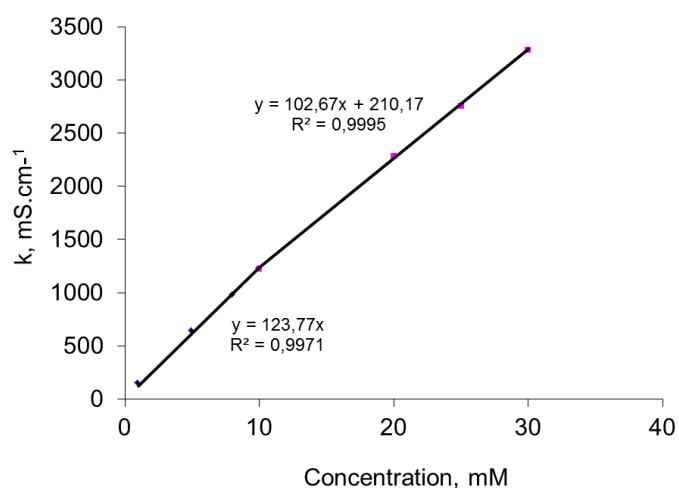
соли. Съединението с кондензиран ацилов остатък - **A6N2CNa** не проявява повърхностна активност, поради тази причина то не е поместено във Фиг. 59

Графичната зависимост на повърхностното напрежение, σ (mN m^{-1}) от $\ln C$ (C , mM) е дадена на Фиг. 59

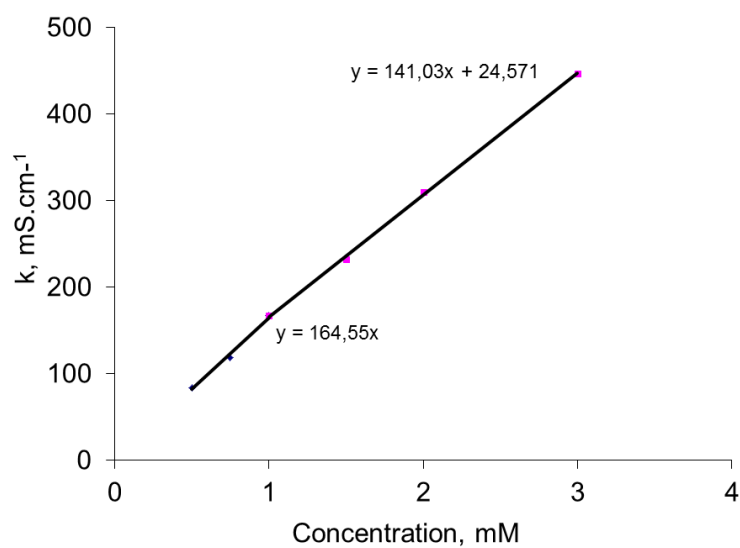


Фиг. 59: Зависимост на повърхностното напрежение от $\ln C$ при 22 °C

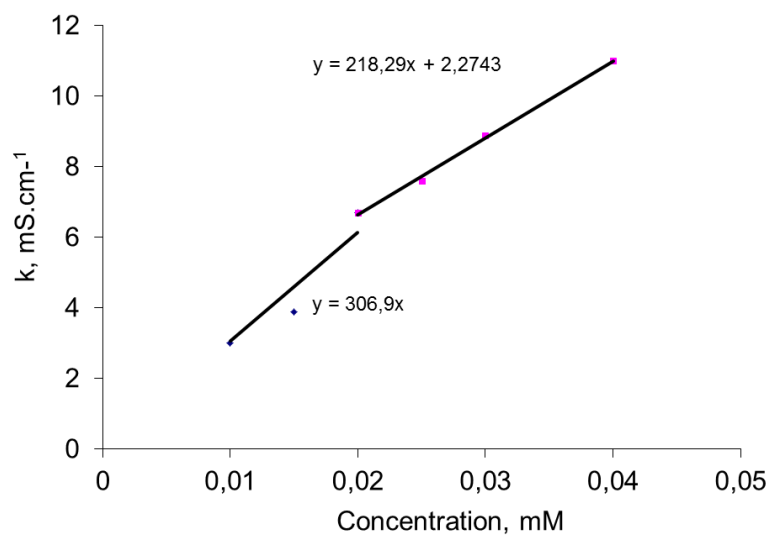
Освен по тензиометричен САС определихме и по кондуктометричен метод. На Фиг. 60 (а) - (с) са представени зависимостите на специфичната електропроводимост на съответните сурфактанти от концентрацията.



Фиг. 60 (а) Графична зависимост на специфичната електропроводимост от концентрацията за съединение **A6N6CNa** ; САС = 10 mM



Фиг. 60 (b) Графична зависимост на специфичната електропроводимост от концентрацията за съединение **A6N10CNa** ; CAC = 1 mM



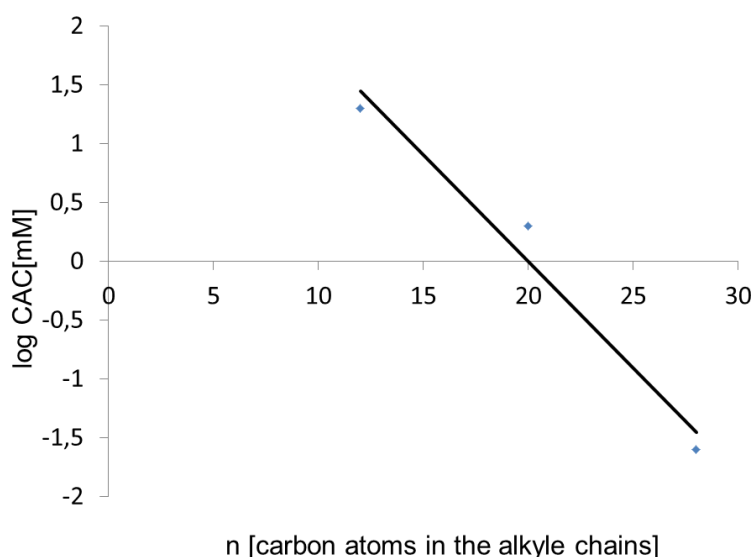
Фиг. 60 (c) Графична зависимост на специфичната електропроводимост от концентрацията за съединение **A6N14CNa** ; CAC = 0.02 mM

Резултатите за CAC, получени по тензиометричен и кондуктометричен метод дават сходни стойности. По-добра представа за това сходство се придобива от табл. 7

Табл. 7: САС, определена по тензиометричен и кондуктометричен метод

Съединение	Брой С-атоми в алифатния фрагмент	САС (mM)	
		Кондуктометричен метод	Тензиометричен метод
A6N6CNa	12	10	20
A6N10CNa	20	1	2
A6N14CNa	28	0.020	0.025

Очаквано, с увеличаване дължината на алифатната верига САС намалява. По-добра представа за зависимостта на САС от дължината на алифатната верига дава Фиг. 61:



Фиг. 61: Зависимост на log САС от броят С-атоми в алифатната верига

При прехода от хексаноат до деканоат намалението е 10-кратно, а при деканоат – тетрадеканоат 80-кратно. За получаване по-добра представа за ПА на синтезираните от нас нови БАКПАВ направихме съпоставка такива, които са вече докладвани в литературата. В литературата не са описани синтези на БАКПАВ от L – Asp, поради този факт сравнителният анализ ще направим с други анионактивни АКПАВ, както и с някои конвенционални катионактивни, Табл. 8.

Табл. 8: Сравнителна съпоставка ($CAC - \sigma_{CAC}$) на синтезираните от нас ПАВ с литературни представители

№	Съединение	Тип на ПАВ	R	CAC (mM)	σ_{CAC} (mN.m ⁻¹)	Източник
1	A6N6CNa	Анионактивен	12	20	41.5	Настоящата дисертация
2	A6N10CNa	Анионактивен	20	2	39.0	
3	A6N14CNa	Анионактивен	28	0.025	31.0	
4	Натриев-1,2-бис-N-диоктил-цистин	Анионактивен	16	0.82	34.3	[67]
5	Натриев-1,2-бис-N-додецил-цистин	Анионактивен	24	0.001	40.8	
6	Натриев дидекаминоцистин	Анионактивен	20	0.75	38.0	[68]
7	Натриев дилауриламцистин	Анионактивен	24	0.02	33.8	
8	Натриев-1,2-бис-N-додеканоил- β -аланин	Анионактивен	24	0.04	27.0	[123]
9	Натриев-N-дилауроилсаркозинат	Анионактивен	24	0.95	33.6	[124]
10	C ₅ H ₁₁ COONa	Анионактивен	6	730	Конд.	[117]
11	C ₉ H ₁₉ COONa	Анионактивен	10	74.5	32.6	[118]
12	C ₁₃ H ₂₇ COONa	Анионактивен	14	6.90	34.5	[119]
13	Бис-тетрадецил-хексаметиламониевбромид ; 14-6-14	Катионанактивен	28	5.62	42.5	[125]
14	Бис- додецил-хексаметиламониевбромид ; 12-6-12	Катионанактивен	24	1.12	42.5	[126]
15	N,N'-бисдодецил-серин-аминопропан	Анионактивен	24	0.27	33.2	[38]
16	N,N'- бисдодецил-серин-аминохексан	Анионактивен	24	0.40	32.1	
17	N ^{α} , N ^{ω} -бис (N ^{α} -лауриларгинин) α , ω -хексилдиамнодихидрохлорид	Катионанактивен	24	0.28	30.0	[11]
18	SDS Натриев додецил сулфат	Анионактивен	12	8.20	32.5	[32]

R – брой въглеродни атоми в алифатния фрагмент

С промяна на мастният остатък от капронов (C₅H₁₁CO) в капринов (C₉H₁₉CO) се благоприятства намаляване на CAC и повърхностното напрежение (ред 1 и 2). Очевидна е разликата при промяна на алифатния фрагмент от капронов (C₅H₁₁CO) в миристинов, тук CAC намалява **800** -кратно, съпроводено със значително редуциране на повърхностното напрежение σ_{CAC} (ред 1 и 3). При съпоставка с натриевите соли на изходните мастни киселини – капронова (ред 10), капринова (ред 11) и миристинова (ред 12) CAC намаляват съответно – **36**, **37** и при **A6N14CNa** отнесено към C₁₃H₂₇COONa – **276** пъти, т.е. постигаме по-висока повърхностна активност при значително по-ниски концентрации.

По отношение на Ser базирани близначни сърфактанти, поместени в Табл. 8, ред 15 и 16 получените от нас съединения показват CAC с един порядък по-ниска при приблизително еднаква σ_{CAC} . За Цистиновите (ред 4 – ред 7), β -аланиновите (ред 8) и саркозиновите (N-метилглицин), ред 9 анионактивни ПАВ се докладват стойности на CAC и σ_{CAC} , близки до тези от получената от нас близначна серия.

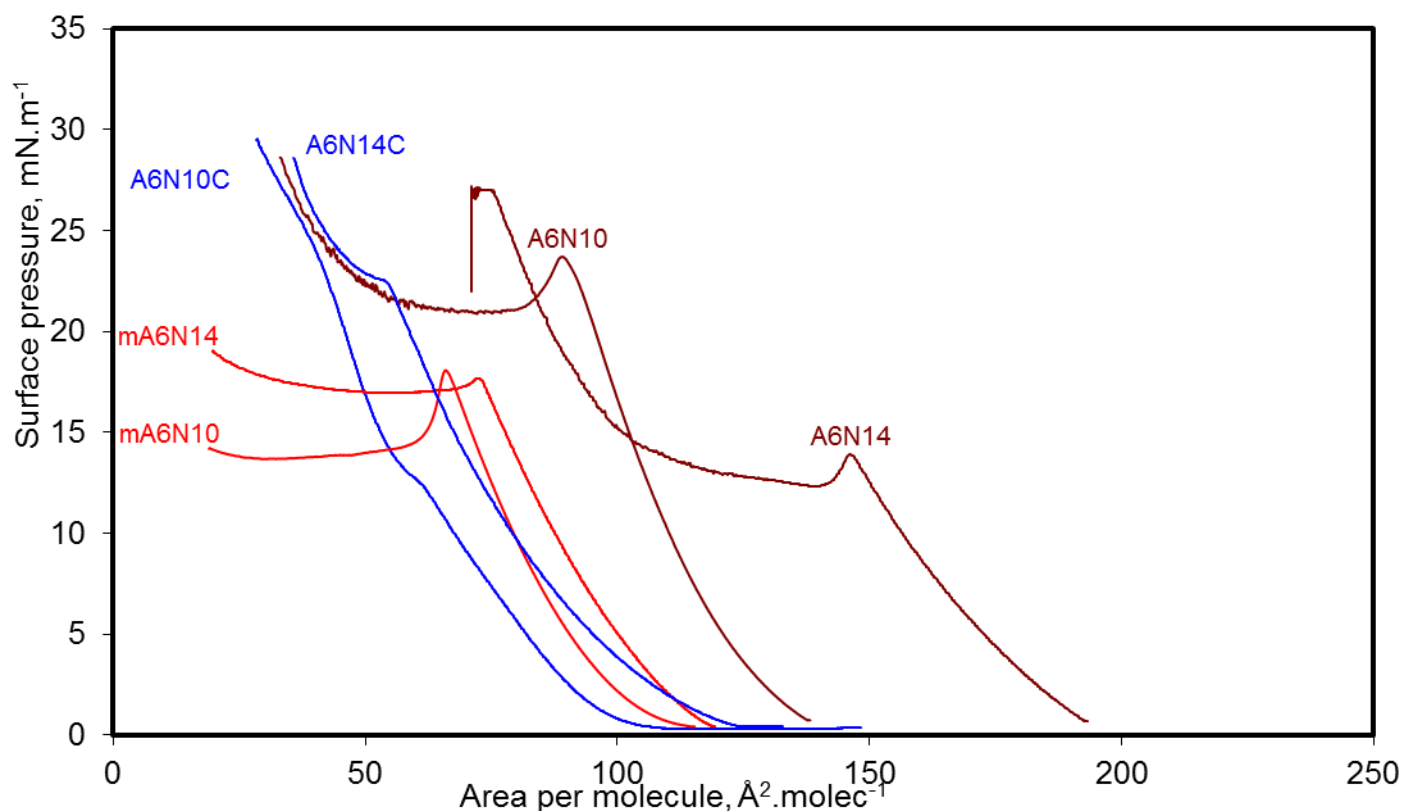
При съпоставка на **A6N14CNa** с конвенционалният катионактивен аналог – bisQuats – бис-тетрадецилхексаметиламониевбромид синезираното от нас съединение е с над 200 пъти по-ниска САС и значително по-ниска $\sigma_{\text{CАС}}$.

3. Сравнителна съпоставка на повърхностната активност на мономерна и близначна серия ПАВ.

3.1. Мономолекулни слоеве

От данните представени на Фиг. 62 (обобщение на фиг. 40 и 50) се вижда, че от нейногенните ПАВ, тези които имат по-дълги хидрофобни опашки (производните на декановата и тетрадекановата киселина), както мономерни – **MA6N10** и **MA6N14**, така и близначни **A6N10** и **A6N14** образуват мономолекулни слоеве, а в условията на компресия дават π -A изотерми. При сравнението на изотермите от данните за колапса очевидна разликата има в MMA за **MA6N10** и **MA6N14** - около $10 \text{ \AA}^2$ и за **A6N10** и **A6N14** – около $50 \text{ \AA}^2$ има значимо несъответствие. Това още веднъж подчертава, че определените MMA не са реални площи на молекулата на граничната повърхност, а са стойности повлияни от надмолекулните структури .

Производните на хексановата киселина, както мономерно - **MA6N6**, така и близначно - **A6N6**, проявяват един и същи тип поведение, на пръв поглед образуват монослой, чиято изотерма показва, че при компресия настъпва както реорганизация на молекулите, така и разтваряне, тъй като в крайна сметка не се стига до колапс. Явно, дължината на алкиловия сегмент от 5 въглеродни атома не е води до достатъчна хидрофобност на неполярната част и молекулата като цяло има по-висока разтворимост и поведение на вещество с ниска ПА. В конкретния случай това поведение не зависи от броя хидрофобни остатъци, а само от тяхната дължина.



Фиг. 62: Сравнителна съпоставка на π -A изотермите на съединения:
A6N10, A6N10C, A6N14, A6N14C, MA6N10 и MA6N14

3.2. Критична концентрация на агрегиране и повърхностно напрежение

На Табл. 9 е поместена съпоставка по отношение CAC и σ_{CAC} на синтезираните от нас две серии анионоактивни ПАВ.

Табл. 9: CAC и σ_{CAC} на мономерни и близначни анионоактивни ПАВ, получени от нас.

	Мономерна серия	Близначна серия	Мономерна серия	Близначна серия
Na-сол	CAC, mM	CAC, mM	σ_{CAC} , mN m ⁻¹	σ_{CAC} , mN m ⁻¹
MA6N6C / A6N6C	15	20	43.5	41.5
MA6N10C / A6N10C	7	2	28.8	39.0
MA6N14C / A6N14C	0.25	0.025	31.1	31.0

Вижда се, че с увеличаване дължината на хидрофобният фрагмент очаквано CAC намалява и при двете серии. По-осезаемо това намаляване е при близначната серия, тук при прехода от деканоат към тетрадеканоат се постига **80** кратна редукция на CAC,

докато при мономерната серия същият преход е съпроводен с **28** картно редуциране на САС. Една вероятна причина за обяснението на това е факта, че мономерната серия се явява мономерна по отношение на аспарагиловият остатък, но не и на дължината на алифатната верига (броя С-атоми в алифатната част). От литературата добре известен факт, е че САС намалява като фактор от 2 при добавяне на една метиленова група [1, 3-9]. При мономерните при прехода деканоат-тетрадеканоат – добавяме 4 метиленови групи, а при близанчните - 8.

При представителите с шест метиленови групи в неполярната част (**MA6N6CNa** и **A6N6CNa**) няма съществена разлика между мономерната и близанчната серия, както по отношение на концентрацията на агрегиране, така и по отношение способността за редуциране на повърхностното напрежение. В същност съединение **MA6N6C** спада към класът на хомодуверижните ПАВ (виж. Табл. 2). **A6N6C** съдържа две карбоксилни групи, това придава по-голяма водоразтворимост на този представител, в сравнение с представителят с една карбоксилна група. Вероятно поради тази причина неговата САС е малко-по-висока от тази при мономерният представител.

Осезаема разлика се наблюдава при съпоставка на **A6N14C** с **MA6N14C**. Близанчният представител редуцира повърхностното напрежение на водата до същата стойност, както и мономерното, но при десетократно по-ниска концентрация.

4. Антимикробна активност

Както беше разгледано в Литературният обзор някои АКПАВ проявяват антимикробна активност. С цел проверка наличието на такава активност при синтезираните от нас нови ПАВ проведохме изследвания в тази посока.

Като обект за изследване избрахме по два мономерни и два близанчни представителя, съответно съдържащи бензилови естерни защити (**A6N10** и **MA6N10**) и свободни карбоксилни групи (**A6N10C** и **MA6N10C**).

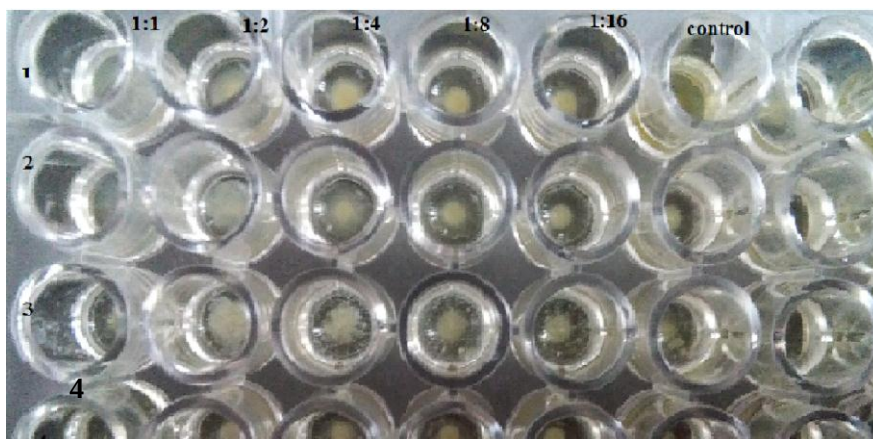
Използвани щамове:

Staphylococcus aureus ATCC 29213, от Американската колекция за микроорганизми и клетъчни култури. *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* от колекцията на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН. Микроорганизмите са култивирани в хранителна среда (Tryptic soy agar, Oxoid) при 37 °C за 24 часа. Приготвени са суспензии на микроорганизмите с концентрация 1×10^5 КОЕ/mL. (колонии образуващи единици) в течна хранителна среда Tryptic soy broth.

Определяне на МИК (минимална инхибираща концентрация).

В 96 ямкови полистиренови плаки са приготвени двукратни разреждания на изследваните вещества от 1:1 до 1:16 с течна хранителна среда Tryptic soy broth, Oxoid в обем 50 μL . Към тези разреждания се добавят 50 μL от суспензиите микроорганизми с концентрация 1×10^5 КОЕ/мл. Плаките се култивират 24 часа на 37°C . МИК е най-голямото разреждане на изследваното вещество, при което не се наблюдава видим растеж в инкубационните ямки. Контролните проби са приготвени с разреждания на DMSO без изпитваните вещества.

Изследваните вещества, с максимална концентрация 25 mg.mL^{-1} в инкубационната смес, не проявиха антимикробна активност. На Фиг. 63 е представена снимка на плаките.



Фиг. 63: Фотография на опитната постановка за определяне на антимикробна активност

Ред 1 са разрежданията на съединение A6N10.

Редове 2, 3 и 4 са съответните разреждания на съединения: A6N10C, MA6N10, MA6N10C От 1:1 /неразредени/ до 1:16.

В този случай е използван *Staphylococcus aureus*. Във всички ямки има бактериален растеж. Само в колонката 1:1 няма, което се дължи на високата концентрация на DMSO при това разреждане (50 %) – отчетено е при контролите с разреждания на DMSO.

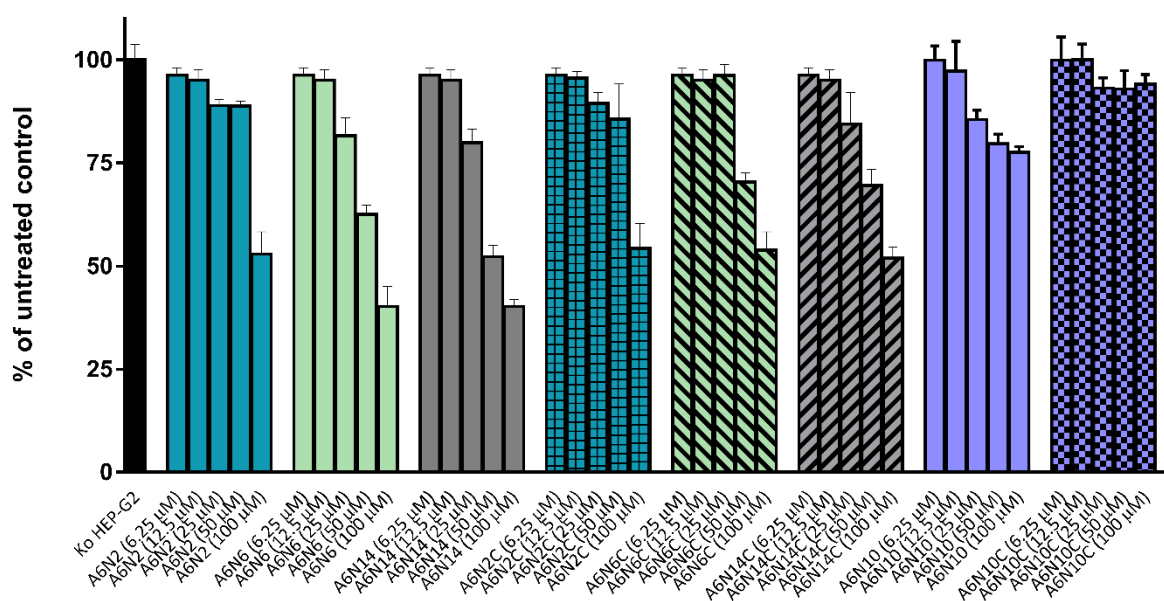
Най-вероятната причина за липса на антимикробна активност се отдава на факта, че съединенията принадлежат към класа на анионактивните сърфактанти. Тази активност, обикновено е характерна при катионактивните ПАВ [39,47,71]

5. Цитотоксичност

За задълбочено изучаване биологичните свойства на новосинтезираните съединения и решаване на Задача 6 от дисертацията подходихме към определяне на тяхната цитотоксичност чрез прилагане на *in vitro* тест за цитотоксичност – „MTT тест златен стандарт“. Биологичните обекти бяха трансформирани клетъчни линии от следните тъкани: човешки хепатоцелуларен карцином HEP-G2, като модел на чернодробна тъкан; миши невробластома Neuro-2a като модел на нервна тъкан ; лимфобластна криза на човешката хронична миело левкемия като модел на хематопоеичната тъкан.

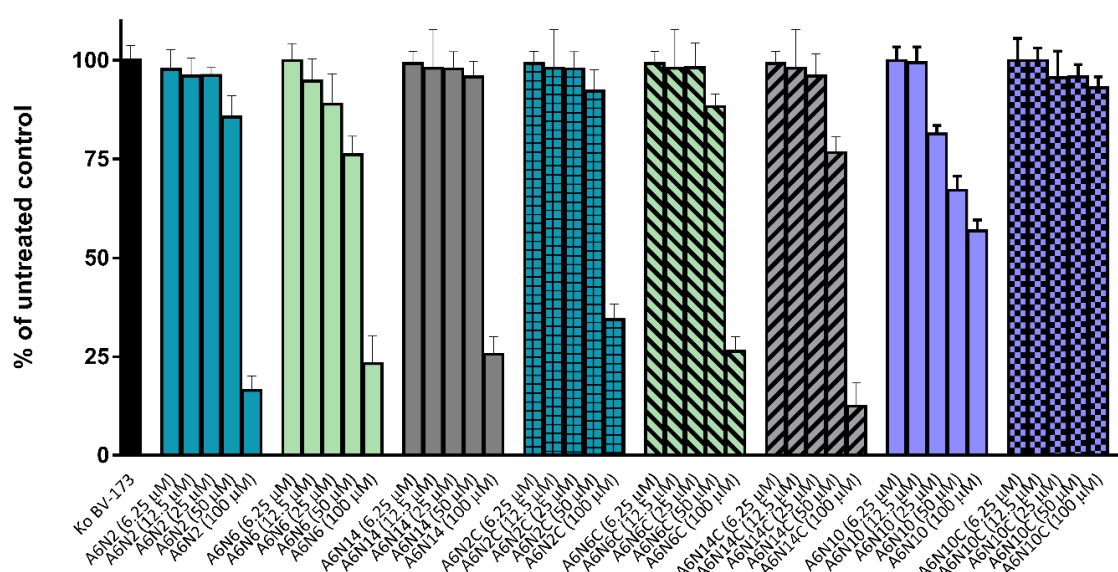
Степента на цитотоксичност съгласно ISO 10993-5 зависи от процента жизнеспособност спрямо контролите и се класифицира както следва: нецитотоксичен > 80 %; слабо токсичен > 60 %; умерено токсичен > 40 % и много токсичен <40% [127,128].

Цитотоксичният потенциал на изследваните съединения се определя чрез стандартен колориметричен метод на базата на MTT за оценка на клетъчната жизнеспособност.

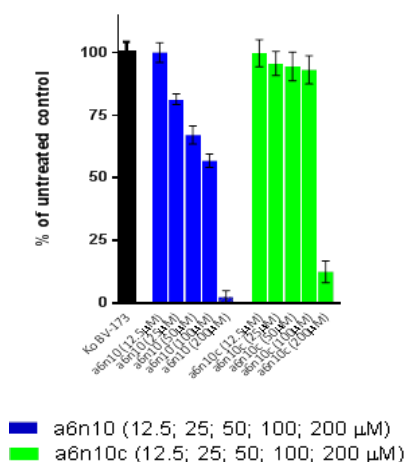


Фиг. 64: Жизнеспособност на HEP-G2 клетъчна линия след 72 часова експозиция на тестваните съединения: A6N2, A6N6, A6N14, A6N2C, A6N6C, A6N14C, A6N10, A6N10C

Резултатите за цитотоксичността на тестваните производни по HEP-G2 клетъчна линия са показани на Фиг. 64. Процентите на клетъчната жизнеспособност за всички вещества в по-ниските изследвани концентрации (6.25, 12.5 и 25 микромола) са високи (жизнеспособност над 80%) и следователно те не са токсични в границите на тези концентрации. За по-високите концентрации: при 50 микромола, съединенията - A6N6, A6N6C, A6N14C, проявяват слаба токсичност, докато A6N14 показва умерена такава. При още по-високата концентрация – 100 микромола, съединенията A6N2, A6N2C, A6N6C и A6N14C са слабо токсични, съединенията A6N6 и A6N14 са по-скоро умерено токсични, а A6N10 и A6N10C са нетоксични.

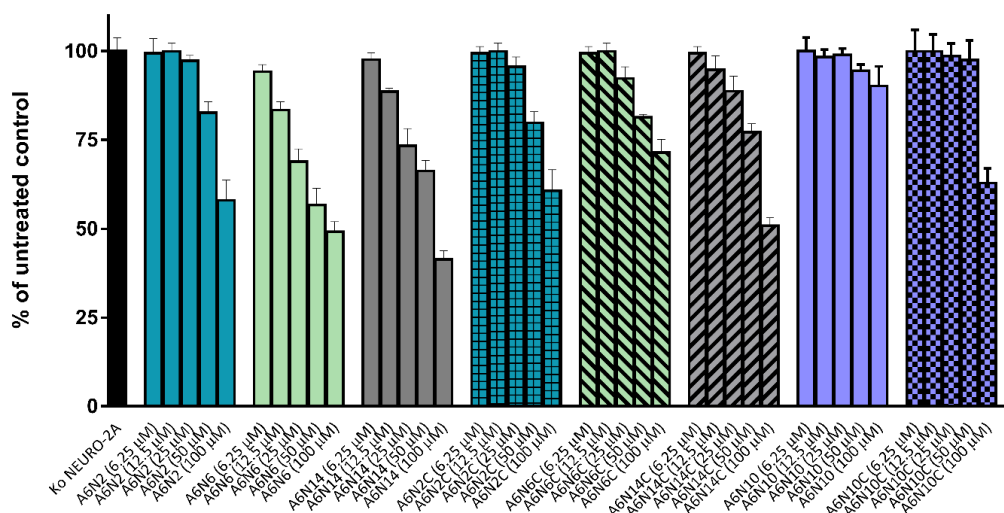


Фиг. 65 (а): Жизнеспособност на BV-173 клетъчна линия след 72 часова експозиция на тестваните съединения: A6N2, A6N6, A6N14, A6N2C, A6N6C, A6N14C, A6N10, A6N10C



Фиг. 65 (b): Жизнеспособност на BV-173 клетъчна линия след 72 часова експозиция на тестваните съединения: A6N10, A6N10C

При BV-173 клетъчната линия, Фиг. 65 (a), (b) - в по-ниските си дози всички изследвани вещества не показват цитотоксичност, докато повишаването на концентрациите води до повишаване на токсичността и при дози около 100 микромола шест от тях (**A6N2**, **A6N6**, **A6N14**, **A6N2C**, **A6N6C**, **A6N14C**) са много високо токсични (жизнеспособност под 40%). Останалите две (**A6N10**, **A6N10C**) също проявяват висока цитотоксичност, но при малко по-високи концентрации – 200 микромола.



Фиг. 66: Жизнеспособност на NEURO-2A клетъчна линия след 72 часова експозиция на тестваните съединения: **A6N2**, **A6N6**, **A6N14**, **A6N2C**, **A6N6C**, **A6N14C** **A6N10**, **A6N10C**

Резултатите за цитотоксичността на тестваните производни върху Neuro-2A клетъчна линия са показани на Фиг. 66. Процентите на клетъчната жизнеспособност за всички изследвани съединения за най-ниските използвани концентрации (6.25 и 12.5 микромола) са високи следователно тези производни не са токсични в тези концентрации (жизнеспособност над 80%). При концентрации 25 и 50 микромола **A6N2**, **A6N2C**, **A6N6C**, **A6N14C**, **A6N10** и **A6N10C** са нетоксични, а **A6N6** и **A6N14** проявяват слаба токсичност. При концентрации от 100 микромола съединения **A6N6**, **A6N14**, **A6N14C** са умерено токсични, съединения **A6N2**, **A6N2C** **A6N6C** и **A6N10C** са слабо токсични, докато съединение **A6N10** остава нетоксично.

Данните за IC₅₀ са представени в Таблица 10.

Табл. 10: Цитотоксичност IC_{50} [$\mu M \pm SD$] на изпитваните съединения върху човешки
туморни клетъчни линии от различен произход.

Съединение / Клетъчна линия	HEP-G2, μM	NEURO-2A, μM	BV-173, μM
A6N2	109 ± 10.5	116.7 ± 11.2	71.8 ± 3.7
A6N6	93.9 ± 6.4	80.6 ± 5.4	69.4 ± 4.9
A6N14	65.7 ± 7.1	77.2 ± 9.5	83.8 ± 5.3
A6N2C	114.6 ± 12.7	127.5 ± 13.2	86.5 ± 4.8
A6N6C	106.0 ± 14.0	205.5 ± 18.9	79.4 ± 5.4
A6N14C	104.1 ± 9.0	104.2 ± 8.3	65.0 ± 4.1
A6N10	> 1000	213.8 ± 17.2	83.8 ± 9.5
A6N10C	246.8 ± 20.5	161.2 ± 13.9	148.9 ± 12.6

IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. Материали

В Табл. 11 са представени основните и спомагателните реактиви, използвани при синтезите на съединенията, описани в дисертацията.

Табл. 11: Реактиви и спомагателни материали

Рекатив	Източник
Вос – Asp (OBzl) – OH	Alfa Aesar
1,6-Диаминокесан	Sigma Aldrich
Аминохексан	Alfa Aesar
TBTU	NovaBiochem
DIPEA	Alfa Aesar
TEA	Sigma Aldrich
TFA	Merck/Alfa Aesar
Тетрадеканова киселина	Alfa Aesar
Деканова киселина	Merck
Хексаноил анхидрид	Merck
Хексаноилхлорид	Alfa Aesar
Деканоилхлорид	Alfa Aesar
Миристоилхлорид	Alfa Aesar
Оцетен анхидрид	Merck
DMF	Merck
Етилацетат	Валерус
Петролев етер	Валерус
Хлороформ	Валерус
Оцетна киселина	Sigma Aldrich
Метанол, безводен	Merck
Катализатор 10% Pd / C	Sigma Aldrich
Лимонена киселина	Валерус
Натриевхидрогенкарбонат	Валерус
Натриев хидроксид	Валерус
Хроматографски плаки Silica gel 60 F254	Merck
Универсален лакмус 1-14	Валерус

Всички реактиви са с аналитична чистота и са използвани във вида, в който са закупени, без допълнително пречистване.

Хроматографска подвижна фаза за тънкослойна хроматография:

S1: CH₃Cl / AcOH = 9 / 1

2. Методи

2.1. Синтези на нови мономерни ПАВ на базата на L - Аспарагинова киселина

Всички синтези са проведени в лабораториите на катедра „Органична химия“ при ХТМУ – София.

Новополучените съединения са прекристализирани из подходящи разтворители, упоменати в съответните методики.

Структурите са доказани със съвременни инструментални техники: ¹H NMR и ¹³C NMR на апарат Bruker Avance -II+ - 600 MHz spectrometer, както и MAC – спектри, снети на апарат Thermo Finnigan LCQ. За близначната серия е снет FTIR спектър, както и е проведен елементен анализ за част от представителите на тази серия.

Точката на топене, след прекристализация, е определена на апарат на Kofler, наличен в катедра „Органична химия“

2.1.1. Получаване на Вос-МА6

N-Voc- L-Asp(OBzl)–N⁶- хексиламид

Вос – Asp (OBzl) – OH - 1.2 екв. се разтварят в DMF (1 гр. от аминокиселината в 5 мл. DMF). Разтвора се поставя на магнитна бъркалка при ледена баня и се изчаква охлаждане до температура 0 - 5 °C. Към така охладеният разтвор на малки порции се прикапва 1.0 екв. аминохексан. След това се прибавя 1.2 екв. TBUTU и 1.2 екв. DIPEA. Температурата се поддържа 0 – 5 °C за 2 ч., след което реакцията продължава при стайна температура до изчерпване на аминохексанът, като се следи посредством тънкослойна хроматография в подвижна фаза S1. Реакцията завършва след 24 ч.

Към реакционната смес се прибавят около 100 мл. 8% NaHCO_3 . Продукта се утаява под формата на бяла утайка. Колбата престоява 1 ч. при стайна температура и след това около 2 ч. в хладилник при 4 – 6 °C. Утайката се филтрува под вакуум, като се промива трикратно с по 10 мл. 8% NaHCO_3 , след това с дестилирана вода до неутрална реакция спрямо универсален лакмус и с 10 % лимонена киселина до $\text{pH} = 3-4$ (около 20 мл.). Последната промивка е отново с дестилирана вода до неутрално pH . След сушене при стайна температура продукта се прекристализира из етилацетат / n-хексан.

2.1.2. Деблокиране на Вос – защитна група

Към точно претеглено количество от съединението с Вос – защитна група се поставят с пипета тип „Резила“ 12 екв. TFA за една Вос – група. Разбърква се на магнитна бъркалка и се проверява посредством TLC в система S1 до изчерпване на изходният Вос – реагент. Свободната amino група дава нинхидринова индикация на старта на хроматограмата.

2.1.3. Получаване на нейногенактивни ПАВ

Към 1.0 екв. Вос – МА6 се добавят 12 екв. TFA и се разбърква на магнитна бъркалка за около 50'. Края на реакцията на деблокиране се установява посредством тънкослойна хроматография (TLC) в подвижна фаза S1. TFA се изпарява под вакуум. Деблокираният по Вос - група остатък се разтваря в DMF (1 гр. в 2 мл.) и се коригира pH с добавяне на малки порции DIPEA до достигане на $\text{pH} = 7$. Сместа се охлажда на ледена баня до 0 °C, след което към така охладената смес се добавят 1.2 екв. от съответната мастна киселина, 1.2 екв. TBTU и 1.2 екв. DIPEA. Реакционната смес се поддържа в интервала 0 – 5 °C за 2 ч., след което реакцията продължава при стайна температура до изчерпване на изходния аминокомпонент. Реакцията се следи чрез тънкослойна хроматография във фаза S1.

След 24 ч. не се получава индикация за аминокомпонент. Към реакционната смес се прибавят около 100 ml 8% NaHCO_3 . Продукта се утаява под формата на бяла утайка. Колбата престоява 1 ч. при стайна температура и след това около 2 ч. в хладилник при 4 – 6 °C. Следва филтруване на утайката под вакуум, като се промива трикратно с по 10 мл. 8% NaHCO_3 , след това с дестилирана вода до неутрална реакция спрямо универсален лакмус и с около 20 мл. 10 % лимонена киселина. Последната

промивка е отново с дестилирана вода до неутрално рН. След сушене при стайна температура продукта се прекристализира из етилацетат. Всички получени продукти са бели кристални вещества, с хроматографска чистота.

2.1.4. Деблокиране на бензиловата естерна защита.

В предварително претеглена облодънна колба с обем 250 мл. се претеглят 1 гр. с точност ± 0.0001 гр. от съответният бензилов естер, добавят се около 150 мл. метилов алкохол и се оставя на магнитна бъркалка при стайна температура до получаване на бистър разтвор. Към разтвора на малки порции се добавят около 50 – 70 мг. катализатор Pd / C със съдържание на Pd – 10 %. Колбата, с помощта на редуктор се свързва с водородна бутилка и се барбутира за около 8-10 ч., като се следи посредством TLC в система S1 до изчерпване на изходният бензилов естер. Прави се отделна хроматограма в същата система, но като проявител се използва 0.04 % етанолов разтвор на бромкрезол зелен, този реагент дава характерно жълто оцветяване на синьо-зелен фон при наличие на свободни карбоксилни групи.

2.1.5. Получаване на натриеви соли

В Бехерова чаша с вместимост 50 мл. се претегля с точност ± 0.0001 гр. - 1 екв. от съответното съединение със свободен С-край. Добавят се 5 мл. дестилирана вода и се хомогенизира на магнитна бъркалка до получаване на фина суспензия. Измерва се рН спрямо универсален лакмус, суспензията има $\text{pH} \approx 4 - 5$. Към нея се добавят 2 екв. натриев хидроксид с концентрация 1 mol l^{-1} , изчаква се 1 мин. и отново се измерва рН, установява се, че от слабо кисела, средата е преминала в алкална, $\text{pH} \approx 10$ и суспензията се е разтворила. Хомогенизирането на магнитна бъркалка продължава около 6-7 часа, като периодично се измерва рН. Реакцията на неутрализация приключва, когато от алкално, $\text{pH} \approx 10$ средата се промени до стойности около $\text{pH} \approx 7 - 8$. След това разтвора се прехвърля в предварително претеглен на аналитична везна кристализатор и се оставя на стайна температура, докато натриевата сол изкрисализира из воден разтвор.

Количествата на изходните реагенти за получаване на съответните мономерни ПАВ са поместени в Табл. 12. Синтезите са проведени по вече описаните методики в точки

2.2.1	—	2.2.4.
-------	---	--------

Табл. 12: Рецептури за получаване на мономерни ПАВ на базата на L – Asp

Код	Изходи реагенти	Грамове (мл.)	Мол x10 ⁻³	Време за реакция, ч.	Rf във фаза S1	Прекриста- лизация	Добив
							%
ВосМА6	1) Вос-Asp(OBzl)-ОН	10,0023	30,93	24	0.80	Етилацетат	95,28
	2) 1-Аминохексан	3,13(4,05)	30,93				
	3) TBTU	9,9494	30,99				
	4) DIEPA	4,00(5,36)	30,94				
MA6N2	1) ВосМА6	2,0027	4,93	1	0.60	Етилацетат	78,27
	TFA	6,74(4,52)	59,11				
	2) <i>in situ</i> DIPEA до pH = 7			24			
	3) оцетен анхидрид	0,51(0,47)	4,95				
MA6N6	1) ВосМА6	1,9999	4,92	1	0.70	Етилацетат- n-хексан	95,41
	TFA	6,73(4,52)	59,03				
	2) <i>in situ</i> DIPEA до pH = 7			24			
	3) хексаноил анхидрид	1,07 (0,99)	5,00				
MA6N10	1) ВосМА6	2,0021	4,92	1	0.75	Етилацетат	92,11
	TFA	6,74(4,52)	59,11				
	2) <i>in situ</i> DIPEA до pH = 7			24			
	3) Деканова киселина	0,8647	5,02				
	4) TBTU	1,6185	5,04				
	5) DIPEA	0,65(0,87)	5,03				
MA6N14	1) ВосМА6	1,9954	4,91	1	0.90	Етилацетат	90,04
	TFA	6,74(4,52)	59,11				
	2) <i>in situ</i> DIPEA до pH = 7			24			
	3) Тетрадеканова киселина	1,1405	5,00				
	4) TBTU	1,6152	5,00				
	5) DIPEA	0,65(0,87)	5,00				

2.2. Методики за синтез на близначни ПАВ

2.2.1. Получаване на Вос-А6

N,N'-бис-(Вос-L-Аспарагил)-1,6-диаминохексан

В облодънна колба с обем 250 мл. се претеглят 2.2 екв. Вос – Asp (OBzl) – OH и се разтварят в DMF (1 гр. от аминокиселината в 10 мл. DMF). Разтвора се поставя на магнитна бъркалка и посредством ледена баня се изчаква охлаждане до температура 0 - 5 °C. Към така охладеният разтвор на малки порции се прикапва 1.0 екв. 1,6-диаминохексан. След това се прибавя 2.2 екв. TBTU и 2.2 екв. DIPEA. Температурата се поддържа 0 – 5 °C за 3 ч., след което реакцията продължава при стайна температура до изчерпване на аминокомпонентът, като се следи посредством тънкослойна хроматография в подвижна фаза S1 и плаката се проявява с етанолов разтвор на нинхидрин (0.5 %). Реакцията завършва след 24 ч.

След изтичане на реакционното време и получаване на отрицателна нинхиринова проба към реакционната смес се прибавят около 100 мл. 8% NaHCO₃. Продукта се утаява под формата на бяла утайка. Колбата престоява 1 ч. при стайна температура и след това около 2 ч. в хладилник при 4 – 6 °C. Утайката се филтрува под вакуум, като се промива трикратно с по 10 – 15 мл. 8% NaHCO₃, след това с дестилирана вода до неутрална реакция спрямо универсален лакмус и с 10 % лимонена киселина до pH = 3 - 4 (около 20 мл.). Последната промивка е отново с дестилирана вода до неутрална pH – индикация. След сушене при стайна температура продукта се прекристализира из етилацетат.

2.2.2. Деблокиране на Вос – защитна група

Към точно претеглено количество от съединението с Вос – защитни групи се поставят с пипета тип „Резила“ 24 екв. TFA. Разбърква се на магнитна бъркалка и се проверява посредством TLC в система S1 до изчерпване на изходният Вос – реагент. Свободната аминок група дава нинхидринова индикация на старта на хроматограмата.

2.2.3. Изолиране на съединение със свободни аминок групи от Вос-А6 (H-A6)

На деблокиран по т.2.2.2. продукт под вакуум се изпарява излишъкът от TFA. След кристализиране на продукта към него се добавят около 50 мл. дестилирана вода на 0.5 гр. продукт, изчаква се разтваряне на магнитна бъркалка при стайна температура и

разтвора се алкализира с твърд Na_2CO_3 до $\text{pH} = 9-10$ спрямо универсален лакмус. Разтвора започва да се изсолва чрез прибавяне на малки порции твърд NaCl до получаване на наситен воден разтвор на солта. Сместа се прехвърля количествено в делителна фуния и се екстрахира 2 x 30 мл. хлороформ. Органичните слоеве се обединяват и се измиват с дестилирана вода до неутрална реакция. Сушат се с безводен Na_2SO_4 , след което се изпаряват под вакуум. Полученото съединение се хроматографира във фаза S1. Прекристализира се из етилацетат – n-хексан. Добив: 70 %.

2.2.4. Получаване на нейногенактивни ПАВ

Към 1.0 екв. Вос – А6 се добавят 24 екв. TFA и се разбърква на магнитна бъркалка за около 75'. Края на реакцията на деблокиране се установява посредством тънкослойна хроматография (TLC) в подвижна фаза S1 и проявител – 0.5 % етанолов разтвор на хинхидрин. TFA се изпарява под вакуум. Деблокираният по Вос-група остатък се разтваря в DMF (1 гр. в 5-7 мл.) и се коригира pH с добавяне на малки порции DIPEA до достигане на $\text{pH} = 7$. Сместа се охлажда на ледена баня до 0°C , след което към така охладената смес се добавят 2.0 - 2.2 екв. от съответната мастна киселина, 2.0 - 2.2 екв. TBTU и 2.0 - 2.2 екв. DIPEA. Реакционната смес се поддържа в интервала $0 - 5^\circ\text{C}$ за 3 ч., след което реакцията продължава при стайна температура до изчерпване на изходният аминокомпонент. Реакцията се следи с тънкослойна хроматография във фаза S1, като се работят две успоредни хроматограми, които се проявяват съответно с нинхидрин и хлор – o-толидин.

След 24 ч. не се получава индикация за аминокомпонент. Към реакционната смес се прибавят около 120 мл. 8% NaHCO_3 . Продукта се утаява под формата на бяла утайка. Колбата престоява 1 ч. при стайна температура и след това около 2 ч. в хладилник при $4 - 6^\circ\text{C}$. Следва филтруване на утайката под вакуум, като се промива трикратно с по 10 – 15 мл. 8% NaHCO_3 , след това с дестилирана вода до неутрална реакция спрямо универсален лакмус и с около 20 мл. 10 % лимонена киселина. Последната промивка е отново с дестилирана вода до неутрална pH – индикация, спрямо универсален лакмус. След сушене при стайна температура продукта се прекристализира из етилацетат. Всички получени продукти са бели кристални вещества, с хроматографска чистота.

2.2.5. Деблокиране на бензиловата естерна защита.

В облодънна колба с обем 250 мл. се поставя 1 гр. (± 0.0001 гр). от съответния дибензилов естер, добавят се около 150 мл. метилов алкохол и се оставя на магнитна бъркалка при стайна температура до получаване на бистър разтвор. Към разтвора на малки порции се добавят около 50 – 70 мг катализатор Pd / C със съдържание на Pd – 10 %. Колбата, с помощта на редуктор се свързва с водородна бутилка и се барбутира за около 10 - 12 ч. Ходът на деблокировката се контролира с TLC в система S1, при проявител – хлор – о-толидин. Прави се отделна хроматограма в същата система, но като проявител се използва 0.04 % етанолов разтвор на бромкрезол зелен, този реагент дава характерно жълто оцветяване на синьо-зелен фон при наличие на свободни карбоксилни групи. Реакцията приключва при отрицателна индикация за на изходния дибензилов естер.

2.2.6. Получаване на натриеви соли

В Бехерова чаша от 50 мл. се претегля около 1 гр. (± 0.0001 гр.) от съответното съединение със свободен C-край. Добавят се 5 мл. дестилирана вода и се хомогенизира на магнитна бъркалка до получаване на фина суспензия. Измерва се рН спрямо универсален лакмус, суспензията има $\text{pH} \approx 4 - 5$. Към нея се добавят 2 екв. натриев хидроксид с концентрация 1 mol.L^{-1} , изчаква се 1 мин. и отново се измерва рН, установява се, че от слабо кисела, средата е преминала в алкална, $\text{pH} \approx 10$ и суспензията се е разтворила. Хомогенизирането на магнитна бъркалка продължава около 6-7 часа, като периодично се измерва рН. Реакцията на неутрализация приключва, когато от алкално, $\text{pH} \approx 10$ средата се промени до стойности около $\text{pH} \approx 7 - 8$. След това разтвора се прехвърля в предварително претеглен на аналитична везна кристализатор и се оставя на стайна температура, докато натриевата сол изкристализира из воден разтвор. Добивите са количествени.

В Табл. 13 са поместени конкретните стойности на изходните реагенти, по които са проведени синтезите на близкочислените съединения. Приложени са методиките в т. 2.2.1 - 2.2.6

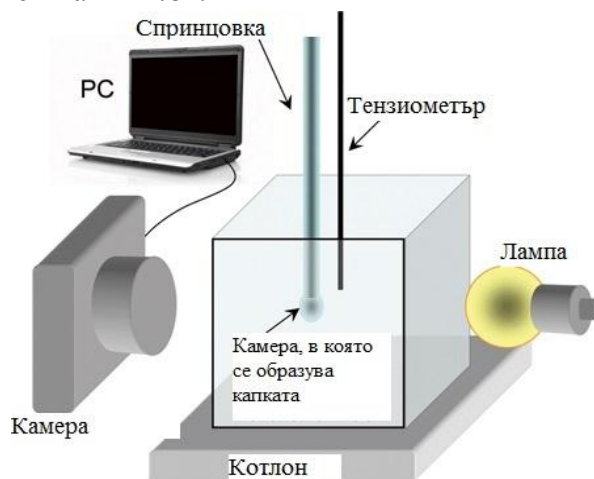
Табл. 13: Рецептури за получаване на близначни ПАВ на базата на L – Asp

Код	Изходи реагенти	Грамове (мл.)	Мол x10 ⁻³	Време за реакция, ч.	Rf във фаза S1	Прекриста- лизация	Добив %
ВосА6	1) Вос-Asp(OBzl)-ОН	12,0037	37,12	24	0.85	Етилацетат	85,24
	2) 1,6-Диаминохексан	2,1573	18,56				
	3) TBTU	12,0982	37,68				
	4) DIPEA	4,82(6,45)	37,29				
A6N2	1) ВосА6 TFA	4,5762 15,80(10,62)	6,30 138,60	1 ч. 15 мин.	0.40	Етилацетат	95,27
	2) <i>in situ</i> DIPEA pH = 7			24			
	3) Оцетен анхидрид	1,33(1,28)	13,00				
	A6N6	1) ВосА6 TFA	1,5003 5,17(3,50)	2,06 45,34			
2) <i>in situ</i> DIPEA pH = 7				24			
3) Хексаноил анхидрид		0,90 (0,97)	4,20				
A6N10		1) ВосА6 TFA	2,0034 6,90(4,64)	2,75 60,50	1 ч. 15 мин.	0.75	Етилацетат- петролев етер (n-хексан)
	2) <i>in situ</i> DIPEA pH = 7			24			
	3) Деканова киселина	0,9905	5,75				
	4) TBTU	1,8550	5,75				
	5) DIPEA	0,74(1,00)	5,75				
	A6N14	1) ВосА6 TFA	1,0000 3,46(2,33)		1,38 30,36		
2) <i>in situ</i> DIPEA pH = 7				24			
3) Тетрадеканова киселина		0,6954	3,03				
4) TBTU		0,9763	3,03				
5) DIPEA		0,39(0,52)	3,03				

3. Определяне на повърхностна активност

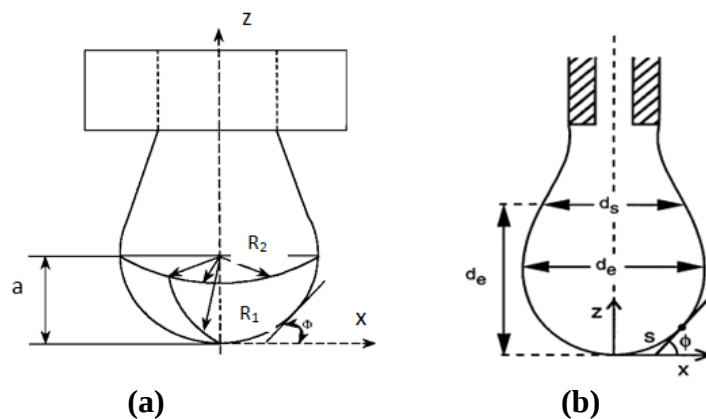
Охарактеризирането на новосинтезираните съединения по отношение на повърхностна активност и измерване на π -А изотерми се провежда в лабораторията по Биофизикохимия на катедра „Физикохимия“ на ФХФ при Софийски университет „Св. Климент Охридски“

В литературата са описани повече от 40 метода за измерване на повърхностното напрежение и повърхностна енергия [1,3-5]. Един от най-използваните оптични методи е методът на висящата капка [129]. Тази капка се образува във въздушна или в друга среда, несмесваща се със средата, чиято повърхностно напрежение се определя. Капката се осветява от лампа и посредством камера се заснема [130]. Схематичен изглед на опитната постановка е представен на Фиг.67.



Фиг. 67: Схематичен изглед на опитната постановка за определяне на повърхностно напрежение по метода на висящата капка.

От заснетото изображение се изчислява профила на капката (Фиг. 68 b), като този профил се сравнява с теоретично изчисления (Фиг. 68 a) по уравнението на *Young-Laplace*



Фиг. 68 (a) теоретичен профил на капката ; (b) корекционен коефициент

$$\frac{1}{\frac{R_1}{a}} + \frac{\sin\phi}{\frac{x}{a}} = -B \frac{z}{a} + 2 ; B = \frac{a^2 g \Delta\rho}{\sigma} \quad \text{Уравнение 2,}$$

Където:

$\Delta\rho$ – разлика между плътностите на флуидите (плътността на флуида и междуфазовата граница) ;

g – гравиметрична константа ;

σ – междуфазово напрежение ;

a – радиус на кривата.

Профилът на капката е функция от ПН.

Bashforth и Adams преобразуват уравнението на *Young-Laplace* във вида, от който се изчислява повърхностното напрежение:

$$\sigma = \frac{g D_e^2 \Delta\rho}{\frac{D_s}{D_E}} \quad \text{Уравнение 3,}$$

Където:

D_e^2 – екваториален диаметър на капката

$\frac{D_s}{D_E}$ - корекционен фактор

D_s – диаметър на капката, измерен хоризонтално, на разстояние D_E , Фиг. 67 (b)

За целите на настоящата дисертация при определяне на повърхностното напрежение на новите съединения използвахме апарат: Ramé-Hart Model 290 Automated Goniometer with DROPImage Advanced v2.4.

Кондуктометричното определяне на критичната концентрация на агрегиране се преведе на WTW inoLab 720 with a conductivity cell Tetracon 325

4. Мономолекулни слоеве

4.1. Методика за получаване на изотерми повърхностно налягане (π) – молекулна площ (A)

Използвахме стандартна тefлонова вана с изходна площ 475.2 cm² и подложка двойно дестилирана вода. С микропипета тип *Hamilton* равномерно на малки порции по цялата площ на тefлоновата ваната се нанася около 40-55 μ L разтвор на пробата в леснолетлив органичен разтворител. Използваните концентрации са от порядъка 1 mg / 1 mL. Изчакват

се 10 - 15 минути за изпаряване на разтворителя, за протичане на най-интензивните реорганизационни процеси и формирането на повърхностния монослой. Образуваният монослой се свива с постоянна скорост $U_b = 10 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. По време на свиването намалява средната площ (A) и повърхностното налягане (π) нараства. π се измерва по метода на Wilhelmy, като платинената пластинка се потапя така, че да образува контактен ъгъл с водната фаза $\theta = 0^\circ$. Всички измервания бяха извършени на тъмно и при стайна температура $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

4.2. Метод на Wilhelmy

Това е метод за измерване на повърхностното напрежение (двумерното повърхностно налягане π), при който се използва платинена пластинка и автоматична везна (KSV-2200, Финландия), свързана с персонален компютър.

При допирание на плоска платинена пластинка с повърхността на течност, поради взаимодействието между молекулите на течността и твърдата повърхност (платината) се образува определен контактен ъгъл θ (или ъгъл на омокряне).

Ако пластинката е окачена на чувствителна везна, може да се измери теглото (G) на повдигнатия мениск. Решението на системата, включва уравнението на *Laplace* за капилярното налягане:

$$P_\sigma = \frac{\sigma}{R} \quad \text{Уравнение 5,}$$

където R – радиус на кривина

и уравнението, описващо формата на повърхността дава израз за повърхностното напрежение:

$$\sigma = \frac{G}{\Pi} \cdot \cos \theta \quad \text{Уравнение 6,}$$

Където:

Π - периметър на пластинката.

При платинена пластинка с контактен ъгъл $\theta = 0^\circ$

$$\pi = \Delta\sigma = \frac{G_0 - G}{\Pi} \quad \text{Уравнение 7,}$$

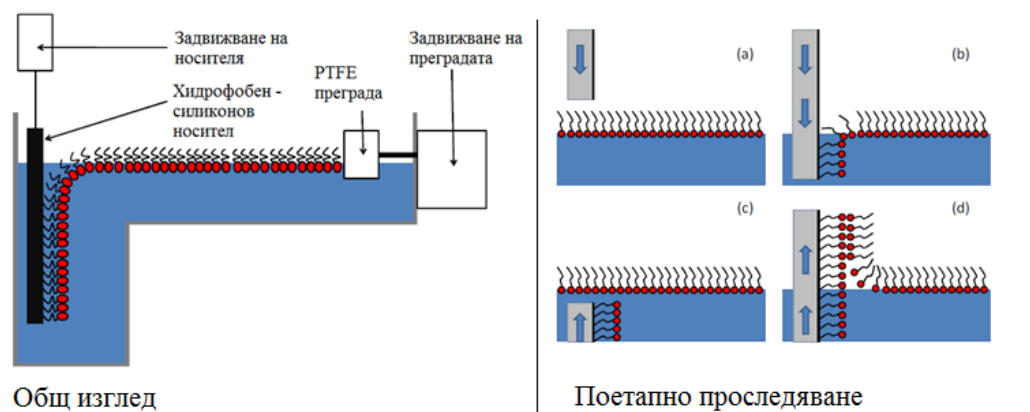
Където: G_0 – тегло на мениска, образуван от чиста водна повърхност; G - тегло на мениска, образуван от монослоя.

Точността, с която се измерва повърхностното налягане е $\pm 0.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

4.3. Отлагане на монослоеве - Langmuir-Blodgett филми

За да се осъществи преносният процес е необходимо повърхността – носител да бъде потопена във водната фаза под приблизителен ъгъл от 180° [131]. Схема на процеса на отлагане на мономолекулен слой върху неполярна повърхност е представена на Фиг. 68. След потапяне на хидрофобната подложка тя се покрива изцяло с формираният монослой, като неполярните части прилепват плътно към нея, а полярните глави са ориентирани навън от нея, в посока обема на PTFE преграда (към течната фаза), т.е. подложката вече е хидрофилизирана, Фиг. 69 (с). При реверсивното движение вече хидрофилизираната подложка си взаимодейства с полярните фрагменти от молекулите, формиращи монослоят и това предизвиква отлагане на втори слой, при който полярните групи са ориентирани една към друга Фиг. 69 (d). По този начин могат да се отложат няколко мономолекулни слоя един върху друг.

За отлагане на идентичен, равномерен филм от съществено значение е поддържане на постоянно повърхностно налягане, това се постига чрез поддържане в неподвижно положение на бариерата (виж Фиг. 37 Литературен обзор).



Фиг. 69: Схематична илюстрация на процеса на отлагане на Langmuir-Blodgett филми върху неполярна повърхност [113]

- (a) – изходен мономолекулен слой ;
- (b) – начало на процеса на отлагане ;
- (c) – пълно потапяне на хидрофобния носител ;
- (d) – реверсивно извеждане на подложката, което води до отлагане на втори слой.

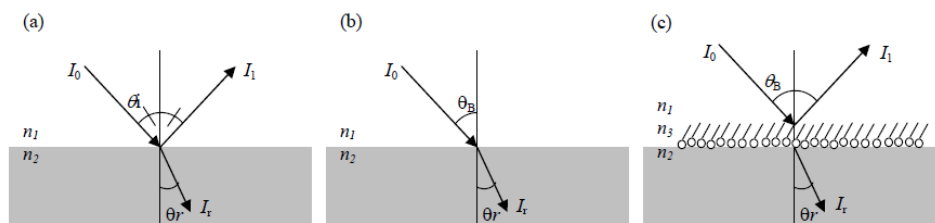
5. Техники за наблюдение на надмолекулни комплекси

5.1. Сканираща електронна микроскопия (SEM)

Тя дава възможност за получаване на изображение в порядъка до 1 000 000 кратни увеличение на обекта, така се получава възможност за наблюдение и заснемане на наноразмерни структури. В основата си метода се състои в бомбардиране на наблюдаваната проба с високоенергетичен поток от ускорени електрони и в резултат възниква лъчение, то се характеризира с много малка енергия. Тези електрони имат способността да излизат на повърхността на пробата от дълбочина в порядъка на 1 – 10 nm, което позволява получаване на обемни изображения, както и качествено охарактеризиране на наблюдавания образец [132]. Морфологията на пробите, представени в дисертацията е определена чрез **SEM микроскоп Jeol Scanning Electron Microscope JSM-5510 (Jeol Ltd.)** в катедра „Приложна неорганична химия“ на ФХФ при СУ “Св. Климент Охридски“. Като покривни стъкла за пробите са използвани микроскопски стъкла с размери 12 x 12 мм, предварително почистени с Бихромна смес.

5.2. Метода на Brewster Angle Microscopy (BAM)

(BAM) е все по-често използвана оптична техника за наблюдение и получаване на ясни изображения от мономолекулни слоеве. Това е недеструктивен метод, при който не се изисква внасяне на допълнителни компоненти в системата. Методът се състои в облъчване на изследваният обект с лазерен лъч, под определен ъгъл, известен като ъгъл на Brewster [133]. Когато на междуфазната граница няма адсорбиран монослой лазерният лъч не се отразява и запазва първоначалния си интензитет. При наличие на монослой интензитетът се променя и част от лъча се отразява. Отразената част се събира от колекторна леща и посредством камера, след математическа обработка, изображението се визуализира [134]. На Фиг. 70 процеса е схематично изобразен.



Фиг. 70: Схематично изображение на процеса при отразяване на лъч при BAM [106]

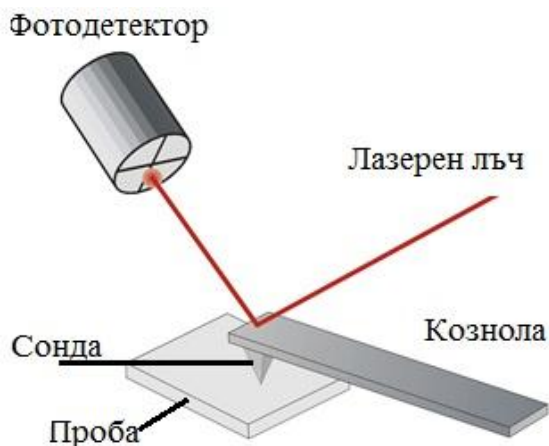
Интензитета на отразеният (I_r) и пречупеният (I_t) лъч зависят от ъгъла на падане (θ_i), от първоначалният интензитет (I_0) и от индексите на пречупване на различните среди (n_1 , n_2), както е илюстрирано на Фиг. 70 (а). При определен ъгъл на падане интензитета на отразеният лъч е приблизително равен на нула, този ъгъл се нарича ъгъл на Brewster, θ_B . За междуфазовата граница вода въздух $\theta_B = 53.06^\circ$, Фиг. 70 (b). Наличието на монослой на междуфазовата граница (n_3) повлиява интензитета на отразеният лъч, тази промяна може да бъде засечена и анализирана с камера, позиционирана по протежението на I_t , Фиг. 70 (c). ВAM – техниката не дава възможност за наблюдения на атомно ниво.

Наблюденията на надмолекулните комплекси на образци от ПАВ, синтезирани в настоящата дисертация са проведени на апарат: **Nanofilm_ultrabam (Accurion); Image sizes 720x400 micrometers**, катедра „Биохимия“ при БФ на СУ „Св. Климент Охридски“

5.3. Атомно – силова микроскопия (Atomic Force Microscopy – AFM)

ВAM техниката не предоставя възможност за получаване представа за топографията на повърхността на пробите. За извличане на тази информация и задълбочено изучаване на надмолекулните комплекси, формирани от съединенията, описани в дисертацията подходихме към прилагането на AFM техника.

Методът има нанометрична разделителна способност. AFM е единствения метод, който показва потенциал за изследване на бързо протичащи процеси на молекулно ниво и може да се използва при изследване еволюцията и кинетиката на промени в повърхностната организация и структура на дадени образци (например, клетъчни мембрани) в нанометричната скала. Посредством AFM са визуализирани и охарактеризирани полимерни филми, полипептидни покрития, наночастици, едностенни и многостенни нанотръбички [134,135]. През последните години AFM – техниката е приложена и за нанопорядъчно наблюдение на монослоеве, прехвърлени върху слюдест носител, посредством техниката на Langmuir-Blodgett. Принципна работна схема на AFM е показана на Фиг. 71



Фиг. 71: Схематично представяне на опитна поставка при АФМ – техника

Сондата се използва за заснемане. Изработена е от силикон или силициев нитрид. Тя е с размери около $3 - 15 \mu\text{m}$ и сканира пробата на разстояние от междумолекулен порядък ($10\text{\AA}$). Закрепена е към конзола с дължина $100 - 500 \mu\text{m}$. Когато сондата се доближи много близо до повърхността на пробата възникват сили на привличане и отблъскване между сондата и повърхността на пробата, тези сили причиняват положително или отрицателно огъване на конзолата, което се детектира от лазерен лъч. Конзолата може да бъде разгледана като пружина. Количеството на генерираната сила между върха и повърхността зависи от твърдостта на конзолата и разстоянието между върха и повърхността. Тази сила може да се изчисли посредством закона на Хук.

$$F = k x \quad \text{Уравнение 8,}$$

Където:

k – константа, зависеща от твърдостта

x – отклонение на конзолата.

Ако k е по-малка от силите, които възникват между върха на конзолата (сондата) и повърхността - конзолата се огъва и тази деформация се засича с фотодетектор. При движение на сондата тя преминава по повърхността на пробата, като я обгръща, това предизвиква флуктуации, възникващи в резултат от електрични, магнитни, капилярни или Ван-дер-Ваалсови взаимодействия между върха на сондата и изследваната проба. Тези флуктуации причиняват изместване на върха. Засичането на това изместване дава топографската картина на повърхността [134-136].

АФМ – изображенията в настоящата дисертация са заснети на апарат: **AFM - Nanoscope V** (Veeco Instruments Inc.). Scale bar is indicated в АФМ лабораторията на ФХФ при СУ „Св. Климент Охридски“

5.3.1. Подготовка на пробите за атомна силова микроскопия (AFM) и обработка на изображенията.

За да могат да се визуализират и охарактеризират монослоевите от изследваните вещества са приложени техниките на Ленгмюир-Блоджет и Атомно-силова микроскопия. За целта слюдена подложка с размери 10 x 10 mm се потапя вертикално в субфазата (двойно дестилирана вода) и се формира монослой от изследвания субстрат. По-нататък монослоевите се свиват до повърхностно налягане $\pi = 9 \text{ mN.m}^{-1}$ и 25 mN.m^{-1} , изчаква се 10 минути за образуването на стабилен повърхностен филм, след което слюдата се изважда от субфазата със скорост 5 mm.min^{-1} . Слюдените филми се оставят в ексикатор на тъмно за 24 часа и преди сканирането им се продухvat с лек поток от азот в продължение на около 1-2 минути.

За представянето на изображенията на AFM беше използвана система NanoScope Multi Mode V (Bruker Ink., Германия). Използваните силиконови конзоли (300 Al-G, Budget Sensors, България) са 30 nm с алуминиево рефлексно покритие. Радиусът на върха е по-малко от 10 nm. Преди сканирането, пробите бяха изсушени внимателно с N_2 газ. Скоростта на сканиране беше зададена на 1 Hz и изображенията бяха получени във режим и на топография и фазово отместване и бяха с резолюция 512×512 пиксела, и бяха записани във формат JPEG. Пробите бяха сканирани в няколко различни места от слюдената подложка.

6. Определяне на антимикробна активност

Около 50 мг от всяко вещество беше разтворено във 0,5 мл DMSO, приблизителна концентрация 100 мг/мл. Инкубационната среда съдържа равни обеми (50 μl) от съответното разреждане на веществата и микроорганизмова суспензия.

Използвани щамове:

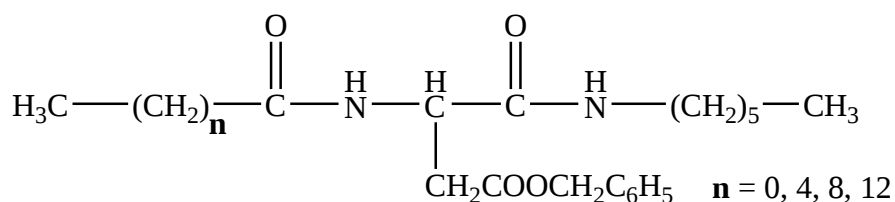
Staphylococcus aureus ATCC 29213, от Американската колекция за микроорганизми и клетъчни култури. *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* от колекцията на Институтата по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН. Микроорганизмите са култивирани в хранителна среда (Tryptic soy agar, Oxoid) при 37°C за 24 часа. Приготвени са суспензии на микроорганизмите с концентрация 1×10^5 КОЕ/мл. (колонии образувачи единици) в течна хранителна среда Tryptic soy broth.

7. Определяне на Цитотоксичност по МТТ – тест

Бяха посяти клетки в 96 ямкови плаки с обем 100 микролитра на ямка. 3×10^5 за суспензионната култура BV-173 и 1.5×10^5 за Neuro-2a и Нер-G2. След 24 часа инкубационен период клетките се третират със серийни разреждания от изследваните вещества. Концентрационният интервал варира от 6.25 до 100 микромола за всяко от изследваните съединения. След време на експозиция от 72 часа, към всяка ямка на културната плака се добавя филтриран стерилизиран субстратен разтвор на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолов бромид - МТТ (5 мг/ мл във фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS)). Изчаква се 1-4 часа време за допълнително инкубиране. След този период се получава виолетово оцветена утайка, дължаща се на формазана. Тази утайка се разтваря в изопропилов алкохол, съдържащ 5% мравчена киселина. След това се измерва абсорбцията на спектрофотометър при дължина на вълната 550 nm. Получените стойности за абсорбцията се сравняват с нулева проба, съдържаща само разтвор на МТТ, изопропанол и мравчена киселина. Стойностите се съпоставят с контролна проба, съдържаща живи клетъчни култури, без изследваните вещества (100% клетъчна жизнеспособност). Получените резултати са обработени по метода на линейната регресия, посредством програмен софтуер GraphPad Prism® 6.0.

V. ИЗВОДИ

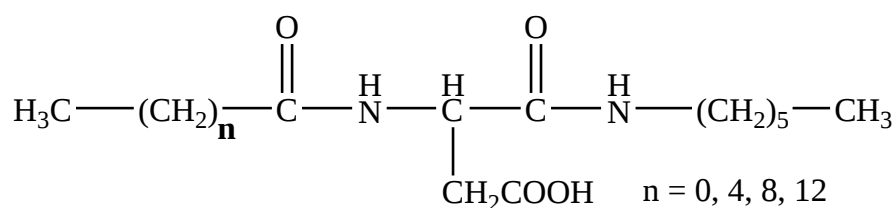
1. Синтезирани са 4 нови съединения, производни на L-Аспарагинова киселина с обща структура:



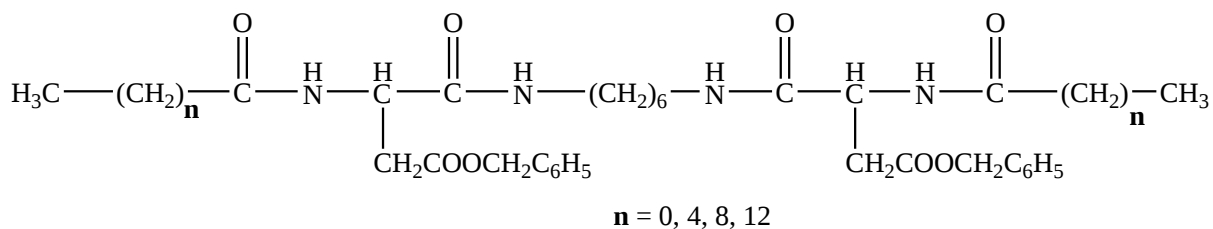
- Охарактеризирани и доказани са със съвременни техники: ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, Масс-спектър, ъгъл на оптично въртене ($[\alpha]_D^{20}$), температура на топене (Тт);
- Съединението с $n=0$ не проявява повърхностна активност (ПА). Останалите членове са двуверижни нейногенни ПАВ, като този с $n=4$ е хомодуверижен, а другите два ($n=8$ и $n=12$) – хетеродуверижни. Те образуват филми (Лангмюирови монослоеве) на междофазовата граница вода/въздух, които са охарактеризирани с π -А изотерми (повърхностно налягане/площ на молекула);

- Морфологията на Лангмюиловите слоеве е изследвана с ВАР и АФМ. Доказана е нишковидна (2-4 nm/500 nm) структура на филмите изградени от съединения с $n=8$ и $n=12$;
- Наблюдения със SEM и оптичен микроскоп потвърждават нишковидната структура на получените от нас съединения;

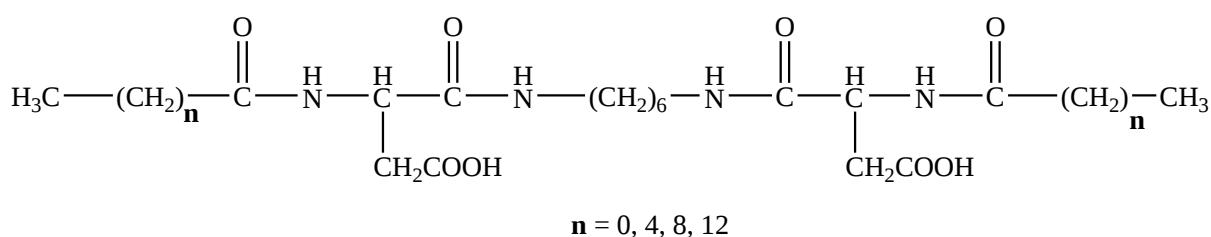
2. Чрез каталитично хидрогениране на съединенията от т. 1 са получени 4 (четири) нови съединения с обща формула:



- Структурата на молекулите им е доказана със съвременни техники: ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, Масс-спектър, ъгъл на оптично въртене ($[\alpha]_D^{20}$), температура на топене (Тт).
 - Синтезирани са натриевите соли на четирите съединения, с цел определяне на критичните концентрации на агрегиране (САС). При $n=0$ не се наблюдава проява на ПА. Останалите три са двуверижни анионоактивни ПАВ. Установено е, че при промяна на n от 4 на 8 се постига над двукратно намаляване на САС, при прехода $n=8$ до $n=12$, 28-кратно, т.е. при промяна на n от 4 на 12 е постигнато ~ 60 кратно редуциране на САС и едновременно с това - $\sim 30\%$ по-ефективно редуциране на повърхностното напрежение.
 - Посредством АФМ, SEM и оптичен микроскоп на образци от новите съединения и от техните натриеви соли е потвърдена нишковидна структура на всички тях.
 - Микроскопски наблюдения (SEM и оптичен микроскоп) на образци от новите съединения и от техните натриеви соли потвърждават нишковидна структура на всички тях.
3. Чрез включване на два остатъка от Аспарагинова киселина са получени димерни (близначни) структури на съединенията посочени в т. 1, които са охарактеризирани със съвременни техники: ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, Масс-спектър, ИЧ, $[\alpha]_D^{20}$, Тт. Общата формула на съединенията е:



- Три от съединенията, при $n = 4, 8$ и 12 , са близначни нейногенни ПАВ. Те образуват Лангмюирови монослое на границата вода/въздух и са охарактеризирани с π -A изотерми;
 - Морфологията на Лангмюировите монослое е изследвана с ВАР и АFМ - Установено е, че получените от съединенията с $n=8$ и $n=12$ монослове са изградени от нишки, които при компресиране се приближават една до друга до образуване на компактен слой от преплетени и подредени фибри;
 - Потвърдена е нишковидната структура и на тези съединения при наблюдение на образци със SEM и с оптичен микроскоп.
4. Посредством каталитично хидрогениране на съединенията от т. 3 са получени димерни (близначни) структури на съединенията посочени в т.2. Те са доказани със съвременни техники: ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, Масс-спектър, ИЧ. Охарактеризирани са и с ъгъл на оптично въртене ($[\alpha]_D^{20}$) и температура на топене (T_f).



- Получени са натриевите соли на съединенията и са определени критичните концентрации на агрегиране (САС). При $n=0$ не се наблюдава проява на ПА. При промяна на n от 4 на 12 е постигнато ~ 800 кратно редуциране на САС;
- Съединенията с $n = 8$ и 12 образуват Лангмюирови монослое на границата вода/въздух. В изследваните с ВАР и АFМ филми от тези съединения не се наблюдава нишковидната структура характерна за съединенията от т.1 и т. 3;

- Микроскопски наблюдения (SEM и оптичен микроскоп) на образци от новите съединения и от техните натриеви соли демонстрира обаче нишковидна структура, за разлика от BAM и AFM снимки на получените филми;
5. Съединенията получени в т.3 и т.4 (всички близначни структури) са изследвани за цитотоксичност спрямо трансформирани клетъчни линии от следните тъкани: човешки хепатоцелуларен карцином HEP-G2; миши невробластома Neuro-2a и BV-173 лимфобластна криза на човешката хронична миело левкемия. Установена е проявяват на слаба до умерена цитотоксичност.
- Като обект за изследване на антимикробиална активност бяха подбрани по два мономерни и два близначни представител, съответно съдържащи бензилови естерни защиты (т. 3, $n=8$ и т. 1 $n=8$) и свободни карбоксилни групи (т. 4 $n=8$ и т. 2 $n=8$). Установи се, че съединенията не проявяват антимикробна активност.
6. Синтезирани са два прекурсора, използвани за получаване на съединенията от т.1 и т.3. Те също са доказани са със съвременни техники: ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, Масс-спектър и са охарактеризирани с ъгъл на оптично въртене ($[\alpha]_D^{20}$), температура на топене (T_m).
7. В настоящия дисертационен труд са синтезирани и охарактеризирани общо 19 нови, неописани в литературата съединения. Някои от тях са получени по два или три метода, за да се определи по-подходящия метод за високи добиви. 12 от тях притежават ПА: 3 са двуверижни нейногенни ПАВ; 3 - двуверижни анионоактивни ПАВ; 3- близначни нейногенни ПАВ; близначни анионоактивни ПАВ.

ПРИНОСИ

1. Дисертацията има принос в химията на Аминокиселинните повърхностно - активни вещества, чрез синтез на 12 нови ПАВ, производни на L-Asp. За пръв път в литературата се докладва синтез на псевдо-двойноверижни и близначни ПАВ от L-Asp. Показателите на два от близначните представителя са равностойни на най-използваните конвенционални ПАВ.
2. За първи път в литературата е докладвано наблюдение на процеса на самоорганизация на молекулите на ПАВ в условията на формиране на мономолекулни слоеве в нишковидни комплекси. Тези комплекси при последваща компреси, образуват „квази“ - монослоеве на границата въздух-вода.
3. SEM и AFM наблюденията на топологията на Langmuir-Blodgett филми и прахови образци показват, че филмите и твърдата фаза на анионактивните ПАВ се състоят от фини нишки от порядъка на нанометри.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД

1. B. Anchev, N. Grozev, K. Mircheva, D. Tsekova

Monlayer structures formed by L-asparic based surfactant; *Nanoscience & Nanotechnology: Nanostructured materials application and innovation transfer* ; Vol. 18, № 2 ; 23-26 (отпечатана в пълен текст от конференция в сборник с редактор)

2. Borislav Anchev, Nikolay A. Grozev, Kristina M. Mircheva, Daniela S. Tsekova

Synthesis, surface activity and supramolecular structures of pseudo double-chained L-Asp based amphiphiles ; *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 55, 1, 2020, 11-22 https://dl.uctm.edu/journal/node/j2020-1/2_19-81_p_11-22.pdf

3. Borislav A. Anchev, Daniela S. Tsekova, Kristina M. Mircheva, Nikolay A. Grozev

Monolayer formed by L-Asp-based Gemini surfactants self-assembled in 1D nanostructures ; *RSC Adv.*, 2019, 9, 33071 ; DOI: 10.1039/c9ra06390k ; **impact factor (2018): 3.049**

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ДОГОВОРИ

- 2008 г.** Договор № 10508/ 2008 г. „Синтез на метални комплекси на производни на α -аминокиселини с никотинова/изоникотинова киселина и изучаване на техните физикохимични свойства и биологична активност.
- 2009 г.** Договор № 10654/ 2009 г. „Синтез на нови производни на триптофана с никотинова и изоникотинова киселина и изследване на техните физикохимични свойства и биологична активност.“
- 2016 г.** Договор № 11599/ 2016 г. „Синтез на нови нискомолекулни производни на аминокиселини като добавки към колоидни системи.“
- Договор № 883 / 2016 г. „Галантаминови и 4-аминопиридинови производни, включващи пептиден мотив с очакван ефект върху болестта на Алцхаймер и множествена склероза.“ (Финансиран от Фонд научни изследвания)
- 2017 г.** Договор № 11710/ 2017 г. „Синтез на нискомолекулни повърхностно-активни вещества на базата на L-аспарагинова киселина (L-Asp).“
- 2019 г.** Договор № 11861/ 2019 г. „Синтез на нискомолекулни повърхностноактивни вещества на базата на L-аспарагинова киселина (L-Asp) и L-валин (L-Val)“