



УДК 547.85'455.522.057

АМИНОНУКЛЕОЗИДЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

XIV.* ОБЩИЙ МЕТОД СИНТЕЗА 3'-АЗИДО-2',3'-ДИДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ

*Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Ажаев А. В.**

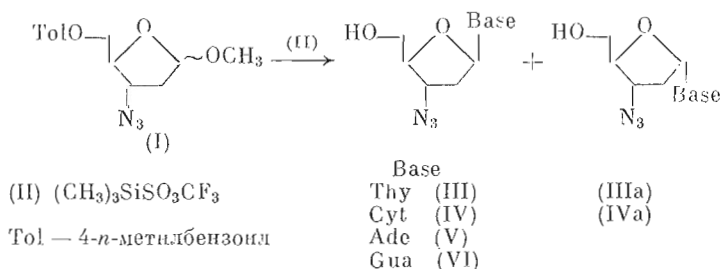
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

**Филиал по разработке ГЛС НИИ по БИХС Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР, Москва*

Предложен общий метод синтеза 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов, основанный на конденсации силильным методом метил-3-азидо-2,3-дидезокси-5-О-*n*-толуил- α , β -D-рибофуранозиды с гетероциклическими основаниями. Изучен аномерный состав продуктов реакции.

В изучении процесса биосинтеза ДНК применение субстратоподобных аналогов нуклеозидов и нуклеотидов имеет большое значение. Эффективными ингибиторами биосинтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами из различных источников, являются 5'-трифосфаты 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозидов [2]. Исходными соединениями для получения таких 5'-трифосфатов могут служить 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозиды, поскольку азидогруппа является удобным латентом аминогруппы в разнообразных химических превращениях.

К настоящему времени в литературе описаны различные методы синтеза этих соединений. Общий подход к получению азидонуклеозидов пиримидинового ряда заключается в приготовлении 2,3'-О-ангидропроизводного 2'-дезоксинуклеозиды с последующим раскрытием 2,3'-О-ангидроцикла неорганическим азидом [3-8]. 3'-Азидо-2',3'-дидезоксинуклеозиды пуринового ряда были получены из 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина методом трансгликозилирования [8, 9]. В настоящей работе представлен общий метод синтеза 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов, основанный на конденсации гетероциклического основания с производным 3-азидо-2,3-дидезоксирибозы (схема).



В качестве углеводного компонента нами была использована смесь α - и β -метилгликозидов 3-азидо-2,3-дидезокси-5-О-*n*-толуил-D-рибофуранозы (I), о синтезе которой мы сообщали ранее [10]. Конденсацию производного (I) с персиллированными гетероциклическими основаниями проводили в среде ацетонитрила или 1,2-дихлорэтана в присутствии кислоты Льюиса. Изучение реакции метилгликозидов (I) с различными осно-

* Сообщение XIII см. [4].

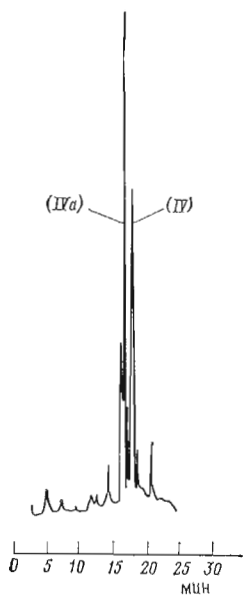


Рис. 1

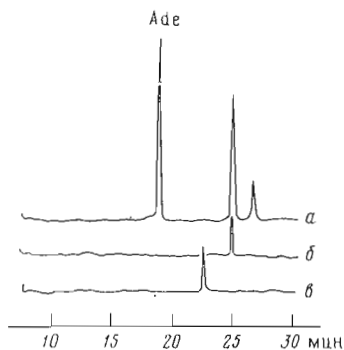


Рис. 2

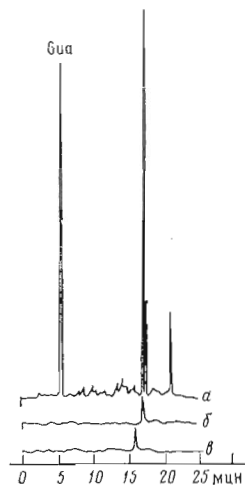


Рис. 3

Рис. 1. ВЭЖХ-анализ реакционной смеси, полученной при конденсации сахара (I) с цитозином. Элюция линейным градиентом метанола (0 — 60%) в 0,1 М NH_4OAc . Скорость потока 1 мл/мин, t 35° С, λ 280 нм. Время удерживания α -аномера (IVa) — 17,2 мин, β -аномера (IV) — 18,4 мин

Рис. 2. ВЭЖХ-анализ продуктов конденсации гликозида (I) с аденином (a) и заводских образцов α (б) и β (в) аномеров. Элюция линейным градиентом В (10—80%) в А.А: 0,1 М NH_4OAc , В: 0,1 М NH_4OAc в 60% CH_3OH . Скорость потока 1 мл/мин, λ 254 нм. Время удерживания α -аномера 22,8 мин, β -аномера (V) 25,6 мин

Рис. 3. ВЭЖХ-анализ продуктов конденсации гликозида (I) с гуанином (a) и заводских образцов α (б) и β (в) аномеров. Условия разделения такие же, как в подписи к рис. 2. Время удерживания α -аномера 15,6 мин, β -аномера (VI) 17,4 мин

ваниями показало, что конденсация успешно протекает в присутствии не только триметилсилилтрифторметансульфоната (II) [11], но и такой кислоты Льюиса, как SnCl_4 . В случае аденинового нуклеозида (V) именно применение SnCl_4 позволяет несколько увеличить выход реакции по сравнению с применением сульфоната (II). Следует отметить, что конденсация происходит лишь в случае 5-кратного избытка кислоты Льюиса по отношению к гликозиду (I). Это объясняется низкой активностью 1-О-метильных производных сахара по сравнению с 1-О-ацетил- или 1-хлорпроизводными. Однако неизбежные потери при последовательном превращении метилгликозида в 1-О-ацетильное и далее 1-хлорпроизводное приводят, по имеющимся в литературе данным [11], к существенному снижению выхода конечного нуклеозида по сравнению с применением непосредственно 1-О-метильного производного.

Интересным оказался анализ аномерного состава образующейся смеси нуклеозидов. Обычно реакция гликозилирования сильными методом с участием 2-дезоксирибозидов приводит к смеси α - и β -аномеров нуклеозидов, соотношение которых зависит как от типа углеводного и гетероциклического компонентов, так и от условий проведения реакции. Действительно, анализ реакционной массы, полученной в результате конденсации гликозида (I) с тиминном и цитозином, показал присутствие обоих аномеров. В случае тимидинового производного аномеры были разделены с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Выход β -аномера (III) составил 20%, а α -аномера (IIIa) — 32%. Анализ методом ТСХ показал, что соотношение α : β не зависит от того, были ли использованы в конденсации индивидуальные α - или β -аномеры гликозида (I) или их смесь.

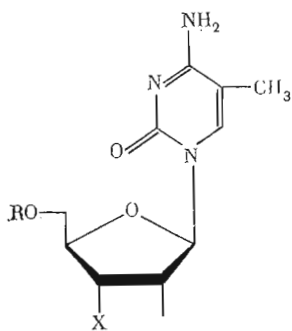
Не зависит состав реакционной массы и от типа используемой кислоты Льюиса. Цитидиновые производные (IV) и (IVa) были выделены в виде смеси, аномерный состав которой был установлен на основании анализа спектров ЯМР и ВЭЖХ (рис. 1). Общий выход реакции составил 57%, а содержание α -аномера было в 2 раза выше, чем β -аномера.

При синтезе пуриновых нуклеозидов (V) и (VI) как в ацетонитриле, так и в дихлорэтане в присутствии SnCl_4 или сульфоната (II) мы не наблюдали образования α -аномеров. Анализ реакционной смеси проводили методом ВЭЖХ, используя в качестве контроля соединения (V), (VI) и их α -аномеры, полученные нами ранее [8] (рис. 2, 3).

В настоящее время мы не можем предложить какого-либо объяснения отсутствию α -аномеров в случае конденсации метилрибозида (I) с пуриновыми основаниями. Как было установлено Уокером и соавт. [12], нуклеозидный синтез с участием производных 2-дезоксирибозы протекает по механизму S_N2 , но осложняется аномеризацией и деструкцией сахара. Кроме того, отмечалось, что β -гликозиды реагируют с образованием α -нуклеозидов быстрее, чем α -гликозиды превращаются в β -нуклеозиды. Таким образом, соотношение аномеров зависит от скоростей реакций аномеризации и гликозилирования и определяется совокупностью термодинамических и кинетических факторов.

Описанным выше методом нами был получен также нуклеозид с неприродным гетероциклическим основанием — бензимидазолом [1]. Это позволяет считать предложенный нами способ общим для получения 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов.

Синтезированные тимидиновый, адениновый и гуаниновый азидонуклеозиды (III), (V) и (VI) были последовательно превращены в моно- и трифосфаты, а затем восстановлены до аминов, как описано ранее [8]. Синтез 5'-трифосфата 3'-амино-2',3'-дидезоксицитидина представлял для нас значительную трудность, так как нуклеозид (IV) был получен в смеси с α -аномером. Поэтому перед нами стояла задача получения более дешевого и доступного аналога природного нуклеозида, 5'-трифосфат которого провлял бы в системах с ДНК-полимеразами такую же активность, как 5'-трифосфат 3'-амино-2',3'-дидезоксицитидина. Можно было предположить, что таким соединением будет 5'-трифосфат 3'-амино-2',3'-дидезокси-5-метилцитидина (X).



- (VII) X = N₃, R = H
 (VIII) X = N₃, R = PO₃H₂
 (IX) X = N₃, R = P₃O₉H₄
 (X) X = NH₂, R = P₃O₉H₄

Для синтеза нуклеотида (X), исходя из тимидинового нуклеозида (III), по методу [13] был получен 3'-азидо-2',3'-дидезокси-5-метилцитидин (VII). Далее нуклеозид (VII) был последовательно превращен в монофосфат (VIII), затем в трифосфат (IX) и восстановлен до аминокнуклеотида (X) как описано в работе [8]. Выход, физико-химические и спектральные характеристики соединений (VIII) — (X) приведены в таблице.

Трифосфат (X) обнаружил активность в качестве терминатора биосинтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами I из *E. coli*, α из тимуса теленка, β из печени крыс, ревертазы из вируса птичьего миелобласто-за*. Во всех случаях это соединение вело себя подобно 5'-трифосфату

* Результаты не приведены.

Выход и физико-химические характеристики синтезированных нуклеотидов

Соединение	Выход, %	R_f в системах			E_f (рН 7,5)	УФ-спектр (вода), λ_{\max} , нм	
		А	Б	В		рН 7	рН 1
(VIII)	78	0,32	0,36	0,58	0,82	278, 256	287, 248
(IX)	62	—	0,06	0,20	0,95	278, 256	287, 248
(X)	85	—	0,02	0,14	0,72	278, 256	287, 248

3'-амино-2',3'-дидезоксицитидина, хотя и было в 3—5 раз менее эффективно по сравнению с ним.

Экспериментальная часть

Растворители высушивали и перегоняли по стандартным методикам. В работе использовали нуклеиновые основания (Sigma, США), гексаметилдисилазан и триметилхлорсилан (Merck, ФРГ), триметилсилилтрифторметансульфонат (Fluka, Швейцария).

ТСХ проводили на стандартных пластинах Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) или Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ). Системы: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 5 : 3 : 2 (А), изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б), диоксан — аммиак — вода, 6 : 1 : 4 (В), хлороформ — метанол, 9 : 1 (Г). Электрофорез выполняли в течение 1 ч на бумаге Whatman I (Англия) в 0,02 М NH₄HCO₃ (рН 7,5) при градиенте потенциала 22 В/см. Величины электрофоретической подвижности указаны относительно соответствующих природных нуклеотидов. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 (Chemapol, ЧССР), ВЭЖХ — на колонке (0,46 × 25 см) с сорбентом Nupersil ODS, 5 мкм (Schandon, Англия) при скорости потока 1 мл/мин. Элюция линейным градиентом метанола в 0,1 М NH₄OAc. Жидкостный хроматограф — Du Pont 8800 (США).

ИК-спектры регистрировали на спектрометре Perkin — Elmer 250 (США) в таблетках KBr, УФ-спектры — на спектрофотометре Beckman (США), спектры ПМР — на спектрометре Varian XL-100-15 (США) с рабочей частотой 100 МГц и Bruker-Spectrospin (США) с рабочей частотой 360 МГц, используя тетраметилсилан в качестве внутреннего стандарта.

Величину удельного вращения определяли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (США) в метаноле. Температура плавления была измерена на приборе Bötius (ГДР).

1-(3-Азидо-2,3-дидезокси-β-D-рибофуранозил)тимин(III) и 1-(3-азидо-2,3-дидезокси-α-D-рибофуранозил)тимин (IIIa). 25 мг (0,2 ммоль) тимина, 29 мг (0,1 ммоль) гликозида (I) [10], 1 мл гексаметилдисилазана и 0,1 мл триметилхлорсилана смешивали и кипятили 3 ч до полного растворения. Реакционную массу упаривали, еще раз упаривали с толуолом. Остаток растворяли в 2 мл ацетонитрила, добавляли 0,05 мл (0,3 ммоль) триметилсилилтрифторметансульфоната (II) и кипятили 4 ч. Смесь охлаждали до 20° С, добавляли 3 мл метанола, насыщенного аммиаком, и оставляли на 18 ч при 20° С. После упаривания остаток наносили на колонку (1,5 × 20 см) с силикагелем. Элюцию проводили смесью хлороформ — метанол (96 : 4). Фракции, содержащие вещество с R_f 0,58 (Г), собирали и упаривали. Получили нуклеозид (III), идентичный по всем физико-химическим характеристикам полученному ранее по методу [8]. Выход 5 мг (20%).

Из фракций, содержащих вещество с R_f 0,53 (Г), было получено 8 мг (32%) соответствующего α-аномера (IIIa). УФ (метанол): λ_{\max} 270 нм, ИК: ν 2100 см⁻¹ (N₃). $[\alpha]_D^{20}$ (метанол) +9° (с 0,07).

¹H-ЯМР (CD₃OD, δ, м. д.): 7,38 (с, 1H, H-5), 5,96 (дд, 1H, H-1', J_{1',2a'} 4,0 Гц, J_{1',2b'} 8,0 Гц), 4,24—4,10 (м, 2H, H-5'_{a,b}), 3,54—3,46 (м, 2H, H-3' и H-4'), 2,76—2,56 (м, 1H, H-2_{a'}), 2,28—2,10 (м, 1H, H-2_{b'}), 1,80 (с, 3H, CH₃).

1-(3-Азидо-2,3-дидезокси-β-D-рибофуранозил)цитозин (IV) и 1-(3-азидо-2,3-дидезокси-α-D-рибофуранозил)цитозин (IVa). 300 мг (26 ммоль) цитозина, 10 мл гексаметилдисилазана и 1 мл триметилхлорсилана кипятили до полного растворения цитозина и упаривали. Остаток растворяли в 20 мл ацетонитрила, к раствору прибавляли 500 мг (1,8 ммоль) гликозида (I) и 1,6 мл (8,6 ммоль) реагента (II). Смесь кипятили 6 ч, охлаждали и распределяли между 50 мл 5% водного раствора NaHCO₃ и 50 мл хлоро-

форма. Органический слой отделяли, водный экстрагировали хлороформом (2×20 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой (2×5 мл), сушили Na_2SO_4 и упаривали. К остатку прибавляли 15 мл метанола, насыщенного аммиаком, и через 24 ч упаривали. Остаток наносили на колонку (3×25 см) с силикагелем. Элюцию проводили 5% метанолом в хлороформе. Фракции, содержащие нуклеозид, объединяли и упаривали. Получили гомогенную по ТСХ смесь аномеров (IV) и (IVa). Общий выход 155 мг (37%).

УФ (метанол): λ_{\max} 273 нм. ИК: ν 2100 cm^{-1} (N_3). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , δ , м. д.): 7,99 (д, 1H, H-6, $J_{6,5}$ 5,3 Гц, β -аномер), 7,70 (д, 1H, H-6, $J_{6,5}$ 5,1 Гц, α -аномер), 6,12 (т, 1H, H-1', $J_{1,2a'} = J_{1,2b'}$ = 5,8 Гц, β -аномер), 6,07 (дд, 1H, H-1', $J_{1',2a'}$ 2,6 Гц; $J_{1',2b'}$ 6,3 Гц, α -аномер), 5,90 (д, 1H, H-5, α -аномер), 5,88 (д, 1H, H-5, β -аномер), 4,35—4,25 (м, 3H, H-3', α - и β -аномеры и H-4', α -аномер), 3,95—3,91 (м, 1H, H-4', $J_{4',3'}$ 4,8 Гц, β -аномер), 3,83 (дд, 1H, H-5a', $J_{5a',4'}$ 3,2 Гц, $J_{5a',5b'}$ 11,8 Гц, β -аномер), 3,73 (дд, 1H, H-5b', $J_{5b',4'}$ 3,2 Гц, β -аномер), 3,65—3,61 (м, 2H, H-5a,b', α -аномер), 2,80 (дд, 1H, H-2a', $J_{2a',3'}$ 6,3 Гц, $J_{2a',2b'}$ 14,5 Гц, α -аномер), 2,49—2,43 (м, 1H, H-2a', $J_{2a',3'}$ 6,7 Гц, $J_{2a',2b'}$ 12,8 Гц, β -аномер), 2,35—2,29 (м, 1H, H-2b', $J_{2b',3'}$ 5,8 Гц, β -аномер), 2,21—2,17 (м, 1H, H-2b', $J_{2b',3'}$ 2,6 Гц, α -аномер).

9-(3-Азидо-2,3-дидезокси- β -D-рибофуранозил)аденин (V). 100 мг (0,42 ммоль) N^6 -бензоиладенина, 2 мл гексаметилдисилазана и 0,2 мл триметилхлорсилана смешивали и кипятили до полного растворения. Смесь упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл ацетонитрила, прибавляли 75 мг (0,26 ммоль) гликозида (I) и 0,15 мл (1,3 ммоль) безводного SnCl_4 в 2 мл 1,2-дихлорэтана. Реакционную массу кипятили 3 ч, охлаждали и выливали в 100 мл 5% водного раствора NaHCO_3 . Экстрагировали хлороформом (3×20 мл), органические экстракты объединяли, промывали водой (1×30 мл), сушили Na_2SO_4 и упаривали. К остатку добавляли 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, и через 24 ч упаривали. Остаток наносили на колонку (2×12 см) с силикагелем, элюцию проводили 3% метанолом в хлороформе. Фракции, содержащие нуклеозид (V), объединяли, упаривали и наносили на колонку с сорбентом Dowex 1 \times 8 (OH⁻). Нуклеозид (V) элюировали 60% водным метанолом, упаривали, кристаллизовали из 10 мл воды. Получили 25 мг (34%) вещества, по всем физико-химическим характеристикам идентичного 3'-азидо-2',3'-дидезоксиаденозину, полученному по методу [8].

9-(3-Азидо-2,3-дидезокси- β -D-рибофуранозил)гуанин (VI). 156 мг (0,39 ммоль) N^2 -пальмитойлгуанина, 3 мл гексаметилдисилазана и 0,3 мл триметилхлорсилана кипятили до полного растворения и упаривали досуха. Остаток растворяли в 6 мл ацетонитрила, добавляли 75 мг (0,26 ммоль) гликозида (I), 0,23 мл (1,3 ммоль) реагента (II) и кипятили 3 ч. Реакционную массу выливали в 150 мл 5% водного раствора NaHCO_3 и экстрагировали хлороформом (3×50 мл). Объединенные экстракты промывали водой (1×30 мл), сушили Na_2SO_4 и упаривали. К остатку добавляли 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, и через 24 ч упаривали. Остаток распределяли между 30 мл смеси 25% водный аммиак — метанол (1 : 1) и 30 мл смеси эфир — гексан (1 : 1). Аммиачно-метанольный слой отделяли, упаривали. Остаток, содержащий нуклеозид (VI), промывали горячей водой (3×5 мл) и сушили в вакууме над P_2O_5 при 40° С. Получили 22 мг (29%) вещества, по всем физико-химическим характеристикам идентичного 3'-азидо-2',3'-дидезоксигуанозину, синтезированному ранее по методу [7].

1-(3-Азидо-2,3-дидезокси- β -D-рибофуранозил)-5-метилцитозин (VII). К раствору 1 г (3,2 ммоль) 3'-азидо-5'-O-ацетил-2',3'-дидезокситимидина (III) в 3 мл пиридина прибавляли 1 г (14 ммоль) триазола и 510 мл (3,4 ммоль) *n*-хлорфенилдихлорфосфата. Реакционную массу перемешивали 3 сут при 20° С и упаривали досуха. Остаток распределяли между хлороформом (10 мл) и водой (10 мл). Органический слой отделяли, водный

экстрагировали хлороформом (2×10 мл), объединенные органические экстракты сушили Na_2SO_4 и упаривали. Остаток растворяли в 10 мл диоксана, добавляли 3 мл 25% NH_4OH и через 1 сут упаривали. Остаток растворяли в 3 мл воды и наносили на колонку ($2,5 \times 12,5$ см) с сорбентом Dowex 50 (H^+). Колонку промывали водой и 50% водным этанолом до исчезновения поглощения в элюате. Вещество элюировали 5% NH_4OH . После упаривания желтый сироп наносили на колонку с сорбентом Dowex 1 (OH^-) и элюировали водой. Получили 650 мг (66%) нуклеозида (VII) в виде бледно-желтой пены.

ТСХ: R_f 0,47 (А), 0,70 (Б), 0,65 (абс. этанол); УФ (вода, pH 7,5): λ_{max} 277 нм (ϵ $8,85 \cdot 10^3$), λ_{min} 255 нм (ϵ $1,2 \cdot 10^3$); (pH 1): λ_{max} 287 нм (ϵ $12,5 \cdot 10^3$), λ_{min} 245 нм (ϵ $1,2 \cdot 10^3$). ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 7,69 (д, 1H, H-6, $J_{6, \text{метил}}$ 1,1 Гц), 6,23 (т, 1H, H-1', $J_{1', 2a'}$ = $J_{1', 2b'}$ = 6,3 Гц), 4,44—4,22 (м, 1H, H-3'), 4,09—3,97 (м, 1H, H-4'), 3,88—3,71 (м, 2H, H-5'_{a, b}), 2,53—2,39 (м, 2H, H-2'_{a, b}); 2,08 (д, 3H, метил).

Авторы благодарят А. М. Атражева (ИМБ АН СССР) и З. Г. Чиджавадзе (ВКНЦ АМН СССР) за изучение 5'-трифосфата 3'-амино-2',3'-дидеокси-5-метилцитидина в системах с ДНК-полимеразами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dyatkina N. B., Krayevsky A. A., Azhayev A. V., Jartseva I. V. *Synthesis*, 1985, № 4, p. 410—411.
2. Chidgeavadze Z., Beabelashvili R., Atrazhev A., Kukhanova M., Azhayev A., Krayevsky A. *Nucl. Acids Res.*, 1984, v. 12, № 3, p. 1671—1686.
3. Fox J. J., Miller N. C. *J. Org. Chem.*, 1963, v. 28, № 4, p. 936—941.
4. Kowolik G., Gaertner K., Langen P. *Tetrahedron Lett.*, 1969, № 4, p. 3863—3865.
5. Hortwitz J. P., Chua J., Noel M. J. *J. Org. Chem.*, 1964, v. 29, № 7, p. 2076—2081.
6. Lin T.-S., Mancini W. R. *J. Med. Chem.*, 1983, v. 26, № 4, p. 544—548.
7. Krenitsky T. A., Freeman G. A., Schaver S. R., Beachan III L. M., Hurlbert S., Cohn N. K., Elwell L. P., Selway J. W. T. *J. Med. Chem.*, 1983, v. 26, № 8, p. 891—895.
8. Зайцева В. Е., Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Скапцова Н. В., Турица О. В., Глущев Н. В., Готтлик Б. П., Ажаев А. В. *Биоорганическая химия*, 1984, т. 10, № 5, с. 670—680.
9. Imazawa M., Eckstein F. *J. Org. Chem.*, 1978, v. 43, № 15, p. 3044—3048.
10. Dyatkina N. B., Azhayev A. V. *Synthesis*, 1984, v. 11, p. 961—964.
11. Vorbrüggen H., Krolkiewicz K., Bennua B. *Chem. Ber.*, 1981, v. 114, p. 1234—1255.
12. Hubbard A. J., Jones A. S., Walker R. T. *Nucl. Acids Res.*, 1984, v. 12, № 17, p. 6827—6837.
13. Lin T.-S., Gao Y.-S., Mancini W. R. *J. Med. Chem.*, 1983, v. 26, № 12, p. 1691—1696.

Поступила в редакцию
27.XII.1985

AMINONUCLEOSIDES AND THEIR DERIVATIVES. XIV. A GENERAL METHOD FOR SYNTHESIS OF 3'-AZIDO-2',3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES

DYATKINA N. B., KRAYEVSKY A. A., AZHAYEV A. V.*

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; *Medical Preparations Development Branch, Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Moscow*

A general method of synthesis of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides, based on the condensation of methyl-3-azido-2,3-dideoxy-5-O-*p*-toluyl- α, β -D-ribofuranoside with the silylated heterocyclic bases was proposed. The anomeric composition of the reaction products was studied.