

Н. Е. Щепина<sup>1\*</sup>, В. В. Аврорин<sup>2</sup>, Г. А. Бадун<sup>3</sup>,  
А. Н. Васянин<sup>4</sup>, С. Н. Шуров<sup>4</sup>, И. М. Агафонова<sup>1</sup>

### ИЗУЧЕНИЕ ИОН-МОЛЕКУЛЯРНЫХ РЕАКЦИЙ НУКЛЕОГЕННЫХ ФЕНИЛ-КАТИОНОВ С ПРОИЗВОДНЫМИ 1,4-ДИАЗИНОВ

Применение ядерно-химического синтеза, основанного на генерировании свободных нуклеогенных фенил-катионов, позволило осуществить прямую реакцию фенилирования атома азота в 1,4-диазинах. Наличие двух метильных заместителей в исследуемом субстрате – хиноксалине – приводит к резкому увеличению радио-химического выхода диазиниевой соли. На основе квантово-химических расчётов сделано предположение о возможности получения дикатиона 2,3-диметил-1,4-дифенилхиноксалиния.

**Ключевые слова:** 1,4-диазиниевые производные, меченные тритием биомаркеры, нуклеогенные фенил-катионы, ядерно-химический синтез.

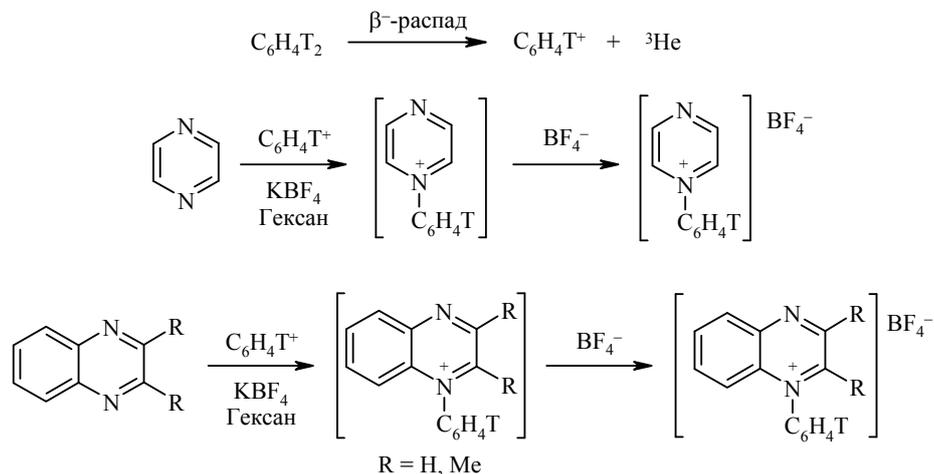
1,4-Диазины и конденсированные системы, содержащие пиразиновый цикл, известны как соединения, обладающие высокой биологической активностью [1]. Пиразиновый цикл встречается как в природных веществах, так и во многих синтетических лекарственных препаратах [2]. Конденсированные гетероциклы, такие как фолиевая кислота, рибофлавин, тетрагидробиоптерин и ксантоптерин, играют важную роль в различных процессах жизнедеятельности [3–4]. Хиноксалин является структурным фрагментом некоторых природных соединений, например пептидного антибиотика эхиномицина [5]. Различные 1,4-диазиновые производные являются важными антибактериальными лекарственными препаратами: сульфапирозин, диоксидин, хиноксидин, сульфациноксалин и др. [3, 6]. 1,4-Диазины обладают широким спектром биологической и фармакологической активности, включая не только антибактериальную [7–9], но и противоопухолевую [10–12] и противовирусную, в том числе в отношении вируса иммунодефицита человека [13–16].

В настоящее время прогресс в области биохимии, молекулярной биологии и генетики, а также практической медицины во многом определяется возможностью широкого использования радиоактивных биологических маркеров. Применение меченых, а особенно это касается меченных тритием соединений, позволяет проводить детальные и высокочувствительные исследования механизмов химических и биохимических процессов в живых организмах, установить пути метаболизма природных и синтетических лекарственных препаратов [17–23].

В связи с этим одной из важных задач представляется поиск новых, нетрадиционных путей получения производных 1,4-диазинов и синтез ранее неизвестных соединений пиразинового ряда, а также разработка простых методов получения меченных тритием радиоактивных маркеров для изучения биохимических процессов. Ранее разработанным нами ядерно-химическим методом была осуществлена неизвестная ранее реакция фенилирования атома

азота цикла в различных производных азинов и успешно синтезированы в одну стадию меченные тритием *N*-фенильные ониевые соединения – перспективные радиоактивные маркеры для биологических исследований [24–30].

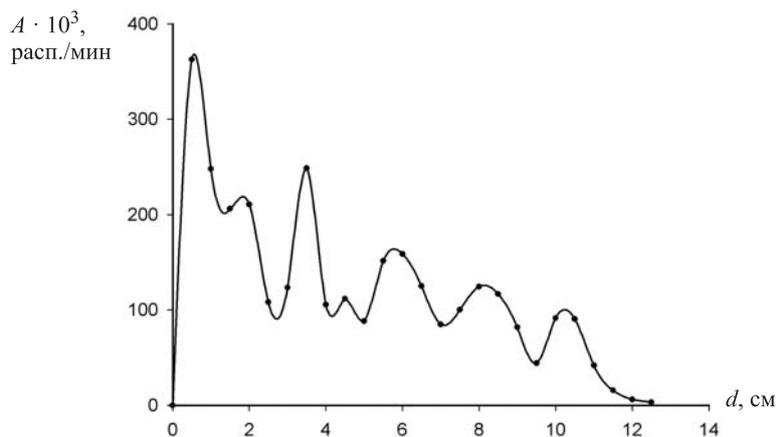
В настоящей статье ядерно-химический метод применён для одностадийного синтеза неизвестных *N*-фенилзамещённых 1,4-дiazиниевых производных, меченных тритием. Реакционные нуклеогенные фенил-катионы генерируются в результате  $\beta$ -распада трития в молекуле *para*-дитритийбензола.



При взаимодействии с неподелённой электронной парой атома азота диазина сильных электрофильных частиц – свободных нуклеогенных фенил-катионов – происходит образование *N*-фенилзамещённых четвертичных diaзиниевых производных. Вследствие того, что в молекуле гетероциклического субстрата имеется несколько центров с повышенной электронной плотностью, возможно образование помимо основного ониевого производного широкого спектра меченых продуктов в результате реакции электрофильного замещения. В связи с этим радиохимический анализ проводился только для основного четвертичного diaзиниевого производного. Поскольку лишь для 2,3-диметилхиноксалина известны классические методы получения *N*-фенильных четвертичных производных, то при ядерно-химическом синтезе для пиразина и хиноксалина в качестве неактивных носителей были использованы известные соли *N*-фенилпиридиния и *N*-фенилхинолиния. На примере синтезированных неактивных солей хинолиния и хиноксалиния подтверждено соответствие хроматографических свойств ониевых производных азинов и diaзинов.

Ион-молекулярные реакции осуществлялись в запаянных ампулах, содержащих тритированный бензол (источник фенил-катионов) и субстраты – пиразин, хиноксалин и 2,3-диметилхиноксалин, нанесённые на кристаллы стабилизирующей соли –  $\text{KBF}_4$ . Ампулы с реакционной смесью выдерживали для накопления продуктов реакции в количествах, достаточных для их надёжного определения (не менее 1 месяца). После накопления ампулы вскрыли и проводили анализ меченных тритием продуктов реакции методом тонкослойной хроматографии.

Радиохроматограмма полученных меченных тритием продуктов в случае ион-молекулярных реакций нуклеогенных фенил-катионов с реакционными центрами 2,3-диметилхиноксалина приведена на рисунке.



Радиохроматограмма меченных тритием продуктов ион-молекулярных реакций в системе:  $C_6H_4T_2$ -2,3-диметилхиноксалин- $KBF_4$ .  $A$  – активность,  $d$  – длина хроматограммы

Первый пик соответствует четвертичной соли *N*-фенил-2,3-диметилхиноксалиния, остальные пики – продукты электрофильного замещения по аннелированному бензольному кольцу или метильному заместителю.

В табл. 1 представлены выходы *N*-фенильных 1,4-дiazиниевых производных. Выходы определяются по отношению к суммарной активности всех меченных тритием продуктов на хроматограмме.

Таблица 1

Радиохимические выходы <i>N</i> -фенильных 1,4-дiazиниевых производных	
Субстрат	Выход ониевой соли, %
Пиразин	$4.0 \pm 0.5$ [31]
Хиноксалин	$6.0 \pm 0.5$ [31]
2,3-Диметилхиноксалин	$21.0 \pm 0.5$

Пиразин и хиноксалин обладают слабыми основными свойствами:  $pK_a$  около 0.6 [32, 33], что проявляется в низкой способности к кватернизации и во многом объясняет небольшие выходы ониевых солей в случае пиразина и хиноксалина (табл. 1). Необходимо отметить, что реакция прямого фенилирования по атому азота гетероцикла diaзинов не осуществима, и только в случае 2,3-диметилхиноксалина известно получение *N*-фенильного производного, причём лишь в результате реакции циклизации [34, 35]. Благодаря наличию метильных групп основность в случае 2,3-диметилхиноксалина резко повышается [36] (известно, что одна метильная группа приводит к увеличению  $pK_a$  примерно на 0.72 единицы [33]). Из полученных экспериментальных данных видно, что введение двух метильных заместителей в 2,3-диметилхиноксалин увеличивает радиохимический выход ониевой соли более чем в 3 раза по сравнению с незамещённым хиноксалином (табл. 1).

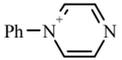
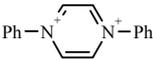
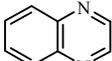
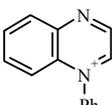
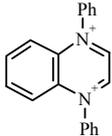
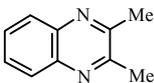
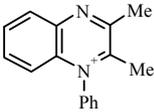
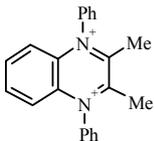
Долгое время реакция дикватернизации, т. е. присоединения сразу по двум атомам азота, в 1,4-diazинах была не осуществима, лишь с применением более сильного алкилирующего реагента – фторбората триалкилоксония, были синтезированы первые соли 1,4-диалкилпиразиния [37]. Использование свободных и высокоактивных нуклеогенных фенил-катионов позволило нам осуществить реакцию прямого фенилирования по атому азота в diaзинах. Наличие второго подпика в пике ониевого производного на представленной

радиохроматограмме (рисунок) позволяет сделать предположение о возможности получения дикватернизованного производного в случае 2,3-диметилхиноксалина. На радиохроматограммах пиразина и незамещённого хиноксалина наличия подобного подпика не наблюдалось [31].

С целью интерпретации полученных радиохимических результатов мы провели квантово-химические расчёты (функционал B3LYP, базис 6-31G(d) с полной оптимизацией всех геометрических параметров) полных энергий фенильного катиона, пиразина, хиноксалина, 2,3-диметилхиноксалина, продуктов их фенилирования по атомам азота, а также зарядов некватернизованных атомов азота по Малликену (табл. 2).

Таблица 2

Полные энергии ( $E_{\text{полн.}}$ ) и заряды атомов азота пиразина, хиноксалина, 2,3-диметилхиноксалина и продуктов их фенилирования по атому азота

Структура	$E_{\text{полн.}}$ , Хартри	Заряд атома азота по Малликену, а. е.*
	-264.3172	-0.376
	-495.7324	-0.321
	-727.0235	-
	-417.9650	-0.459
	-649.3875	-0.410
	-880.6832	-
	-496.6082	-0.523
	-728.0351	-0.476
	-959.3331	-

\* Атомные единицы заряда.

Поскольку в реакции с указанными диазинами участвует фенильный катион, важное значение должны иметь заряды атомов азота (по-видимому, данное взаимодействие должно контролироваться зарядом). В ряду пиразин – хиноксалин – 2,3-диметилхиноксалин заряд атома азота возрастает от  $-0.376$  (в пиразине) до  $-0.523$  а. е. (в 2,3-диметилхиноксалине), в связи с этим взаимодействие последнего с фенильным катионом должно быть наиболее эффективным. Согласно расчётам, полная энергия продукта монофенилирования пиразина на  $0.1522$  Хартри меньше суммарной энергии фенил-катиона ( $E_{\text{полн.}} -231.2630$  Хартри) и пиразина. Для хиноксалина выигрыш энергии при образовании катиона 1-фенилхиноксалиния составляет  $0.1595$  Хартри, а для 2,3-диметил-1-фенилхиноксалиния  $0.1639$  Хартри. Следовательно, образование последнего является более предпочтительным, что подтверждается его большим радиохимическим выходом.

Подобным же способом нами была оценена вероятность образования бисфенильных производных. В катионе 1-фенилпиразиния полный заряд неква-тернизованного атома азота снижается на  $0.055$  а. е. заряда, в катионе 1-фенилхиноксалиния – на  $0.049$  а. е., а в случае катиона 2,3-диметил-1-фенилхиноксалиния – на  $0.047$  а. е. Но по абсолютному значению отрицательный заряд атома азота N-4 в катионе 2,3-диметил-1-фенилхиноксалиния в ряду монофенилированных диазиниевых катионов оказывается самым большим, что, по-видимому, является одной из причин взаимодействия этого катиона с фенил-катионом и образования дикатиона 2,3-диметил-1,4-дифенилхиноксалиния. Выигрыш в энергии при его образовании, рассчитанный аналогично, составил  $0.035$  Хартри. Для дикатионов 1,4-дифенилхиноксалиния и 1,4-дифенилпиразиния аналогичные значения оказались соответственно  $0.033$  и  $0.028$  Хартри, и их образование представляется менее вероятным. Всем рассчитанным частицам отвечают минимумы на поверхностях потенциальной энергии, что подтверждается отсутствием отрицательных собственных значений матрицы Гессе.

Применение ядерно-химического синтеза, основанного на генерировании свободных нуклеогенных фенил-катионов, позволило осуществить прямую реакцию фенилирования атома азота в 1,4-диазинах. Наличие двух метильных заместителей в исследуемом субстрате – хиноксалине – приводит к резкому увеличению радиохимического выхода диазиниевой соли. На основе квантово-химических расчётов сделано предположение о возможности получения дикатиона 2,3-диметил-1,4-дифенилхиноксалиния.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Радиохроматография полученных тритированных соединений выполнена на стеклянных пластинах Analtech TLC Uniplates USA (C-18 silica gel matrix, UV)  $5 \times 20$  см в MeCN. Участки адсорбционного слоя хроматограммы по  $0.5$  см длиной счищались в раствор диоксанового сцинтиллятора. Определение  $\beta$ -радиоактивности меченных тритием соединений проведено на жидкостном сцинтилляционном счётчике RackBeta 1215 (LKB Wallac, Finland). Квантово-химические расчёты выполнены с помощью пакета программ Firefly [38] на суперкомпьютере ПГУ-ТЕСЛА Центра "Параллельные и распределённые вычисления" ПГНИУ. Для получения двукратно меченного тритием бензола использован газообразный тритий (ПО Изотоп, Россия) с изотопной чистотой 99%. Синтез и анализ дитритийбензола – источника нуклеогенных фенил-катионов – осуществлён по разработанной ранее методике [29].

**Получение неактивных свидетелей и носителей.** Вследствие отсутствия *N*-фенильных ониевых солей пиразиния и хиноксалиния были использованы известные соли соответствующих азинов – пиридиния [39] и хинолиния [40]: тетрафторборат *N*-фенилпиридиния, т. пл. 179–180 °С (H<sub>2</sub>O) (т. пл. 179–180 °С [39]) и перхлорат *N*-фенилхинолиния, т. пл. 156–157 °С (H<sub>2</sub>O) (т. пл. 157 °С [41, 42]). Иодид 2,3-диметилхиноксалиния получен по описанной методике [34] из 2-аминодифениламина и диацетила, т. пл. 203–204 °С (EtOH) (т. пл. 204 °С [34]).

**Синтез дитритийбензола.** Синтез двукратно меченного тритием бензола из *para*-дибромбензола по реакции каталитического дегалогенирования проводят в вакуумной системе газообразным тритием [29]. Химическую и радиохимическую чистоту синтезированного дитритийбензола контролируют методом газовой хроматографии с детекторами по теплопроводности и проточным пропорциональным счётчиком (детектор по радиоактивности). Объёмная удельная активность полученного гексанового раствора дитритийбензола составляет 1 Ки/моль. Разбавление является важным для предотвращения процессов радиолиза, а также для уменьшения выхода меченых побочных продуктов.

**Синтез меченного тритием тетрафторбората 2,3-диметил-1-фенилхиноксалиния.** В стеклянную ампулу объёмом 0.5 мл помещают ~200 мг кристаллов стабилизирующей соли KBF<sub>4</sub>, которые затем покрывают 200 мкл эфирного раствора 2,3-диметилхиноксалина (8.7 мг, 0.055 ммоль). Затем растворитель отгоняют в вакууме, и при охлаждении жидким азотом в ампулу вводят 1 мкл гексанового раствора C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>T<sub>2</sub>. Соотношение меченый бензол/субстрат составляет не менее чем 1:10<sup>3</sup>, это уменьшает количество побочных продуктов. Ампулу запаивают и выдерживают 1–2 месяца для накопления продуктов ядерно-химического синтеза. Накопление меченных тритием соединений осуществляется при пониженной температуре (–18 °С) для предотвращения термического разложения. Ампулу вскрывают, содержимое переносят в специальный флакон, добавляют 0.5 мл бензола и 0.5 мл ацетонового раствора носителя – иодида 2,3-диметилхиноксалиния [34] (1 мг/мл). Непрореагировавший тритированный бензол несколько раз отгоняют в вакууме. К сухому остатку добавляют 0.5 мл ацетона и отбирают пробы по 5 мкл для разделения меченых соединений методом ТСХ.

**Синтез меченного тритием тетрафторбората *N*-фенилхиноксалиния.** Аналогично осуществляют ядерно-химический синтез ониевой соли *N*-фенилхиноксалиния. Ампула содержит 1 мкл гексанового раствора дитритийбензола и 7.2 мг (0.055 ммоль) хиноксалина.

**Синтез меченного тритием тетрафторбората *N*-фенилпиразиния.** Ядерно-химический синтез проводится аналогично. В ампулу вносится 1 мкл гексанового раствора меченого бензола и 4.4 мг (0.055 ммоль) пиразина.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (базовая часть).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. W. Kaim, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **22**, 171 (1983).
2. G. W. H. Cheeseman, E. S. G. Werstiuk, in *Advances in Heterocyclic Chemistry*, A. R. Katritzky (Ed.), Elsevier, New York, 1972, vol. 14, p. 99.
3. В. И. Иванский, *Химия гетероциклических соединений*, Высшая школа, Москва, 1978, p. 348
4. A. F. Pozharskii, A. T. Soldatenkov, A. R. Katritzky, *Heterocycles in Life and Society*, Wiley, New York, 1997, p. 64.
5. A. Dell, D. H. Williams, H. R. Morris, G. A. Smith, J. Feeny, G. C. K. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2497 (1975).

6. L. E. Seitz, W. J. Suling, R. C. Reynolds, *J. Med. Chem.*, **45**, 5604 (2002).
7. J. L. Sessler, H. Maeda, T. Mizuno, V. M. Lynch, H. Furuta, *Chem. Commun.*, 862 (2002).
8. G. J. Kirkovits, R. S. Zimmerman, M. T. Huggins, V. M. Lynch, J. L. Sessler, *Eur. J. Org. Chem.*, **22**, 3768 (2002).
9. P. Ghosh, A. Mandal, *Adv. Appl. Sci. Res.*, **2**, № 1, 255 (2011).
10. A. Iwashita, K. Hattori, H. Yamamoto, J. Ishida, Y. Kido, K. Kamijo, K. Murano, H. Miyake, T. Kinoshita, M. Warizaya, M. Ohkubo, N. Matsuoka, S. Mutoh, *FEBS Lett.*, **579**, 1389 (2005).
11. M. M. Ghorab, F. A. Ragab, H. I. Heiba, M. G. El-Gazzar, M. G. El-Gazzar, *Acta Pharm.*, **61**, 415 (2011).
12. S. I. Kovalenko, I. S. Nosulenko, A. Yu. Voskoboynik, G. G. Berest, L. N. Antipenko, A. N. Antipenko, A. M. Katsev, *Med. Chem. Res.*, **22**, 2610 (2013).
13. K. Tushima, R. Takano, T. Ozawa, S. Matsumura, *Chem. Commun.*, 212 (2002).
14. A. M. Sh. El-Sharief, Z. Moussa, *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 4315 (2009).
15. A. M. Almerico, M. Tutone, A. Guarcello, A. Lauria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1000 (2012).
16. M. Asif, *Med. Chem.*, **2**, 151 (2012).
17. G. V. Sidorov, N. F. Myasoedov, *Russ. Chem. Rev.*, **68**, 229 (1999). [*Успехи химии*, **68**, 254 (1999).]
18. J. A. Egan, R. P. Nugent, C. N. Filer, *Appl. Radiat. Isot.*, **57**, 837 (2002).
19. J. A. Egan, C. N. Filer, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **258**, 185 (2003).
20. D. G. Ahern, A. G. Laseter, C. N. Filer, *Appl. Radiat. Isot.*, **65**, 827 (2007).
21. G. Mousseau, Q. Raffy, O. P. Thomas, M. Agez, R. Thai, J. P. Renaul, S. Pin, F. Ochsenbein, J.-C. Cintrat, B. Rousseau, *Biochemistry*, **49**, 4297 (2010).
22. R. Simonsson, G. Stenhagen, C. Ericsson, C. S. Elmore, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **56**, 334 (2013).
23. Y. Tian, Y. Hong, S. J. Bonacorsi, A. Balog, S. Gong, *J. Labeled Compd. Radiopharm.*, **57**, 1 (2014).
24. Н. Е. Щепина, В. В. Аврорин, Г. А. Бадун, Г. А. Александрова, Патент РФ 2320647, *Бюл. изобрет.*, № 9, 656 (2008).
25. N. E. Shchepina, V. V. Avrorin, G. A. Badun, S. B. Lewis, V. M. Fedoseev, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **64**, 244 (2009). [*Вестн. МГУ*, **50**, 311 (2009).]
26. N. E. Shchepina, V. V. Avrorin, G. A. Badun, G. A. Alexandrova, S. E. Ukhanov, V. M. Fedoseev, S. B. Lewis, I. I. Boiko, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **45**, 796 (2009). [*Химия гетероцикл. соединений*, 1008 (2009).]
27. Н. Е. Щепина, В. В. Аврорин, Г. А. Александрова, Г. А. Бадун, Патент РФ 2442776, *Бюл. изобрет.*, № 5, 341 (2012).
28. N. E. Shchepina, V. V. Avrorin, G. A. Badun, N. A. Bumagin, S. B. Lewis, S. N. Shurov, *Org. Med. Chem. Lett.*, **2**, 14 (2012).
29. N. E. Shchepina, V. V. Avrorin, G. A. Badun, S. B. Lewis, S. E. Ukhanov, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **48**, 301 (2012). [*Химия гетероцикл. соединений*, 320 (2012).]
30. N. E. Shchepina, V. V. Avrorin, G. A. Alexandrova, G. A. Badun, I. I. Boiko, S. N. Shurov, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **49**, 428 (2013). [*Химия гетероцикл. соединений*, 461 (2013).]
31. N. E. Shchepina, V. V. Avrorin, G. A. Badun, *Open J. Synth. Theor. Appl.*, **2**, 51 (2013).
32. A. K. Patidar, M. Jeyakandan, A. K. Moobiya, G. Selvan, *Int. J. PharmTech Res.*, **3**, 386 (2011).
33. G. B. Barlin, *The Chemistry of Heterocyclic Compounds. The Pyrazines*, John Wiley & Sons, 1982, p. 310.
34. R. M. Anker, A. H. Cook, *J. Chem. Soc.*, 489 (1944).
35. D. Shelz, M. Priester, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 317 (1975).

36. W. L. F. Armarego, C. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, 2012, p. 433
37. T. J. Curphey, K. S. Prasad, *J. Org. Chem.*, **37**, 2259 (1972).
38. A. A. Granovsky, *Firefly. Version 8.0.0*. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.
39. Л. Г. Макарова, А. Н. Несмеянов, *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, 617 (1945).
40. Г. Т. Пилюгин, З. Я. Крайнер, *Докл. АН СССР*, **81**, 609 (1951).
41. Р. Ф. Стаднийчук, Г. Т. Пилюгин, О. Е. Петренко, *Журн. общ. химии*, **40**, 1834 (1970).
42. Б. И. Ардашев, В. И. Минкин, *Журн. общ. химии*, **29**, 200 (1959).

<sup>1</sup> *Естественнаучный институт  
Пермского государственного национального  
исследовательского университета,  
ул. Генкеля, 4, Пермь 614990, Россия  
e-mail: neshcherina@mail.ru*

*Поступило 22.07.2014*

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7/9,  
Санкт-Петербург 199034, Россия  
e-mail: VVAvrorin@yandex.ru*

<sup>3</sup> *Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова,  
Ленинские Горы, 1, Москва 119991, Россия  
e-mail: badunga@yandex.ru*

<sup>4</sup> *Пермский государственный национальный  
исследовательский университет,  
ул. Букирева, 15, Пермь 614990, Россия  
e-mail: seshurov@yandex.ru*