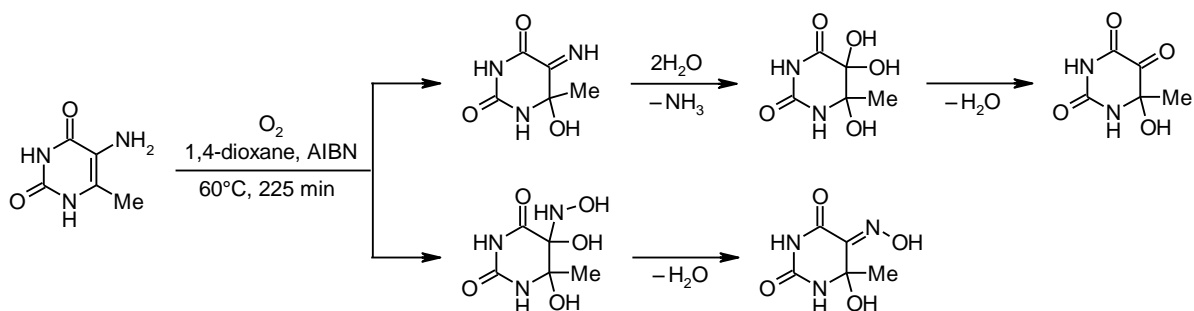


Механизм окисления 5-амино-6-метилурацила пероксильным радикалом 1,4-диоксана

Люция Р. Якупова^{1*}, Ригина А. Насибуллина¹, Светлана Ф. Петрова¹, Марат Ф. Абдуллин¹, Шамиль М. Салихов¹, Альфия Р. Гимадиева¹, Рустам Л. Сафиуллин¹

¹ Уфимский институт химии РАН,
пр. Октября, 71, Уфа 450054, Россия;
e-mail: jkupova@anrb.ru

Поступило 5.12.2014
Принято после доработки 23.02.2015



Изучены продукты, образующиеся при взаимодействии пероксильного радикала 1,4-диоксана с 5-амино-6-метилурацилом. Выделены основные продукты: 5,5,6-тригидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион, 6-гидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4,5(3*H*)-трион и 6-гидрокси-5-гидроксиамино-6-метилдигидропиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион. Предложен механизм радикально-цепного окисления 1,4-диоксана в присутствии 5-амино-6-метилурацила.

Ключевые слова: 5-амино-6-метилурацил, 1,4-диоксан, пероксильный радикал, продукты окисления.

Пиримидиновые основания привлекают внимание исследователей, так как находят применение в качестве лекарственных препаратов. Некоторые производные урацила обладают широким спектром фармакологической активности, возможно, связанной с их способностью дезактивировать высокореакционные интермедиаты окисления – пероксильные радикалы (RO_2^\cdot). Установлено, что 5-гидрокси-6-метилурацил ингибирует радикально-цепное окисление изопропилового спирта,^{1–3} 1,4-диоксана,^{4–5} этилбензола,⁶ стирола.⁷ Высокая антирадикальная активность обнаружена у 5-амино-6-метилурацила (**1**). Показано, что он является эффективным ингибитором окисления этилбензола,^{8–9} спиртов в водных растворах¹⁰ и 1,4-диоксана.^{4–5} В настоящее время установлено, что центром, ответственным за ингибирующую активность 5-амино-6-метилурацила (**1**), является аминогруппа.⁵ Дальнейшие превращения образующегося из 5-амино-6-метилурацила (**1**) радикала не исследованы. Подавляющее большинство работ посвящено изучению продуктов, образующихся в реакции гидроксильного радикала (HO^\cdot) с производными урацила. В

результате показано, что основным продуктом окисления является 5,6-дигидрокси-5,6-дигидроурацил.^{11–15} Это позволило установить механизм взаимодействия радикала HO^\cdot с урацилом.

В отличие от гидроксильного радикала, пероксильный радикал RO_2^\cdot имеет более продолжительное время жизни и большую химическую селективность.¹⁶ Механизм взаимодействия урацила с радикалом RO_2^\cdot рассмотрен только на примере 5-гидрокси-6-метилурацила и тимидина.^{3,10,16,17} Результаты наших предыдущих исследований кинетических закономерностей радикально-цепного окисления 1,4-диоксана и этилбензола в присутствии специально подобранного ряда производных 5-аминоурацила позволяют предложить схему их окисления пероксильным радикалом.^{5,9} Для доказательства механизма взаимодействия 5-амино-6-метилурацила (**1**) с пероксильным радикалом 1,4-диоксана необходимы сведения о продуктах, образующихся из соединения **1**. Данные о продуктах окисления 5-амино-6-метилурацила (**1**) каким-либо пероксильным радикалом отсутствуют. В связи с этим в настоящей работе осуществлено выделение и идентификация продуктов

взаимодействия 5-амино-6-метилурацила (**1**) с алкилпероксильным радикалом 1,4-диоксана.

Для генерирования пероксильных радикалов 1,4-диоксана мы использовали его жидкофазное инициированное 2,2'-азобисизобутиронитрилом (AIBN) окисление кислородом воздуха при температуре 333 К.¹⁸ Выбор 1,4-диоксана в качестве окисляемого соединения связан с тем, что урацилы практически нерастворимы в органических растворителях за исключением диметилсульфоксида, 1,4-диоксана и спиртов. Отметим, что при окислении ДМСО алкилпероксильные радикалы не образуются, а при окислении спиртов генерируются два вида радикалов – пероксильный и гидропероксильный. Окисление 1,4-диоксана протекает по радикально-цепному механизму, при этом цепи окисления ведет только пероксильный радикал.¹⁹ Об отсутствии в применяемой системе других реакционноспособных интермедиатов свидетельствуют кинетические закономерности окисления 1,4-диоксана, полученные ранее.¹⁸

Для того чтобы проверить, не протекает ли взаимодействие 5-амино-6-метилурацила (**1**) с образующимся в ходе окисления гидропероксидом, провели следующий эксперимент. Инициированное окисление 1,4-диоксана проводили в течение 30 мин и накопили концентрацию гидропероксида до $6 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹, что значительно превышает его концентрацию в условиях ингибированного окисления. После этого добавляли 5-амино-6-метилурацил (**1**) и следили за поглощением кислорода. Обработка полученной кинетики стандартным методом продемонстрировала, что на кинетику ингибированного 5-амино-6-метилурацилом (**1**) окисления 1,4-диоксана наличие гидропероксида не влияет – длительность индукционного периода и значение константы скорости ингибирования не изменились. Также было показано, что за 370 мин не наблюдается расходования гидропероксида *трет*-амила ($3.3 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹) в присутствии 5-амино-6-метилурацила (**1**) ($2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹). Длительность наших экспериментов не превышает указанное время. Полученные результаты позволяют пренебречь вкладом реакции 5-амино-6-метилурацила (**1**) с промежуточным продуктом реакции гидропероксидом. Такие реакции протекают медленно из-за высокой энергии активации и могли бы сказаться только при достаточно высокой концентрации гидропероксида. В условиях ингибированного 5-амино-6-метилурацилом окисления 1,4-диоксана такие концентрации не достигаются.

В результате окисления 5-амино-6-метилурацила (**1**) после удаления из оксидата растворителя и инициатора полупрепаративно, методом ВЭЖХ, было выделено три основных продукта окисления соединения **1**. Согласно данным спектроскопии ЯМР ¹³C и масс-спектрометрии, двумя из них являются 5,5,6-тригидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (**2**) и 6-гидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4,5(3*H*)-трион (**3**). Спектры ЯМР ¹³C этих соединений удовлетворительно совпадают с литературными данными.^{17,20} В масс-спектре положительных ионов данной фракции были зарегистрированы пики ионов, образующихся в результате захвата соединениями **2** и **3** ионов калия – [M+K]⁺ с

m/z 215 и 197 соответственно.

Третьим продуктом является 6-гидрокси-5-гидроксиимино-6-метилдигидропиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (**4**). Спектры ЯМР ¹H и ¹³C данного соединения согласуются со спектрами аналогичного ему соединения, отличающегося только отсутствием метильного заместителя в положении 6 урацилового цикла.²¹ В масс-спектре соединения **4** зарегистрирован пик иона [M+K+H₂O]⁺ с *m/z* 230, образующегося в результате захвата иона калия. При идентификации данного соединения возникли трудности, связанные с его нестабильностью при хранении в обычных условиях.²⁰ Относительно быстро происходит раскрытие урацилового цикла и образование 5-гидрокси-5-метилимидазолидин-2,4-диона (пик иона [M+K]⁺ с *m/z* 169), который также подвергается деградации, возможно, с образованием *N*-формацетамида, так как в масс-спектре зарегистрирован также пик иона [M+K]⁺ с *m/z* 126. О лабильности продуктов окисления производных урацила пероксильными радикалами свидетельствуют и данные работ^{20,22}.

На основании полученных ранее кинетических закономерностей^{5,9} и анализа образующихся продуктов исследованную реакцию можно описать схемой 1.

Согласно предлагаемой схеме, первой стадией процесса является отрыв атома водорода от аминогруппы 5-амино-6-метилурацила (**1**) пероксильным радикалом RO₂[·]. Образующийся радикал можно представить как суперпозицию граничных структур **1a**,^{11,23} На следующем этапе радикал **1c** может прореагировать с пероксильным радикалом RO₂[·] или с кислородом, что приведет к интермедиатам **1d**,**e** соответственно, из которых затем в любом случае образуется 6-гидрокси-6-метил-5-иминодигидропиримидин-2,4-дион (**1f**). В ходе выделения из реакционной смеси он реагирует с водой,^{10,17} в результате чего образуются 5,5,6-тригидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (**2**) и 6-гидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4,5(3*H*)-трион (**3**).

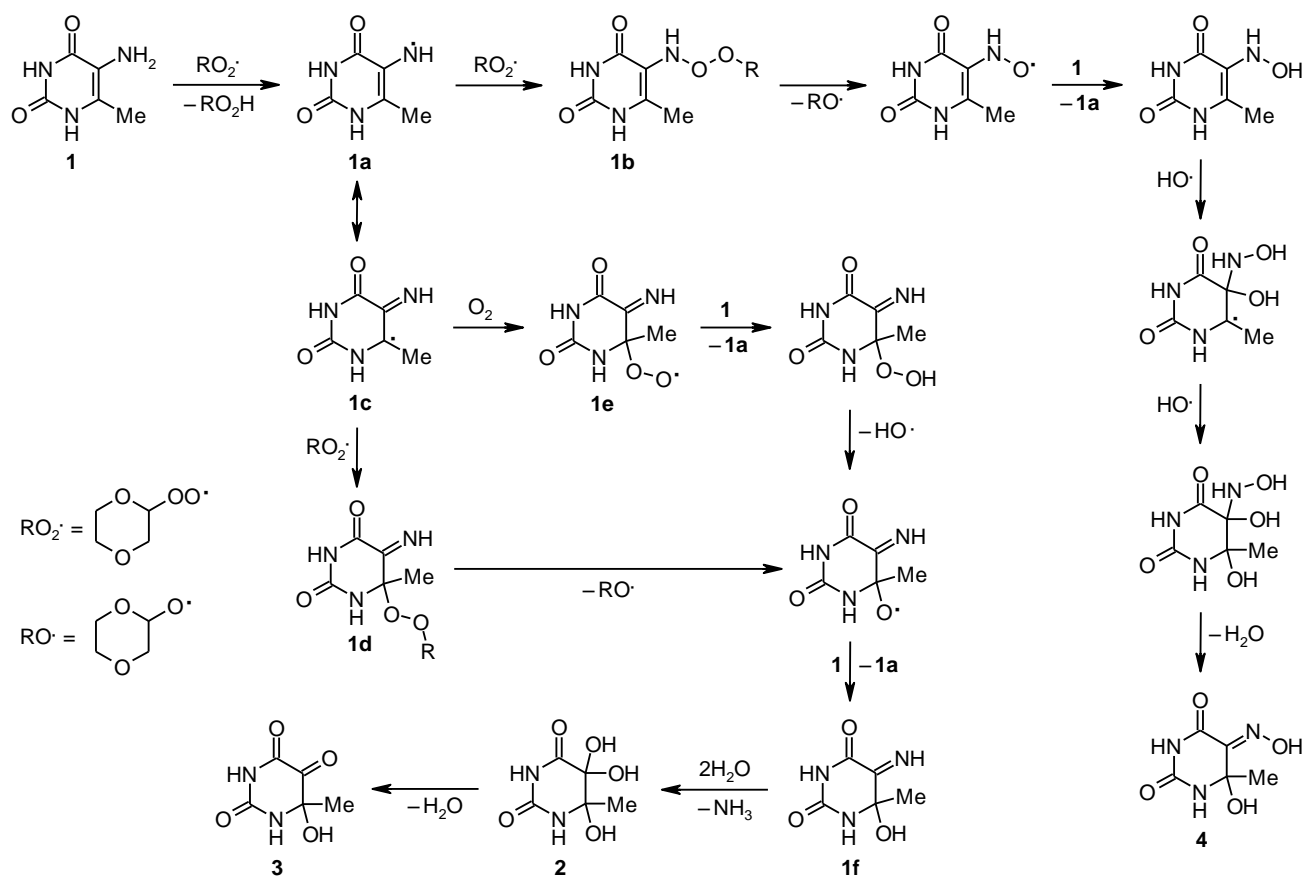
К образованию 6-гидрокси-5-гидроксиимино-6-метилдигидропиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-диона (**4**), по-видимому, приводит трансформация радикала **1b** – продукта взаимодействия радикала **1a** с пероксильным радикалом RO₂[·] (схема 1).

Таким образом, полученные данные о составе продуктов окисления 5-амино-6-метилурацила пероксильными радикалами 1,4-диоксана подтверждают предложенную схему процесса и объясняют наблюдаемые кинетические закономерности радикально-цепного окисления 1,4-диоксана, ингибированного 5-аминоурацилом и его производными.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance-III (500 и 125 МГц соответственно) в ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт ТМС. Масс-спектры в условиях ионизации электрораспылением (200 эВ) зарегистрированы на ВЭЖХ масс-спектрометре LCMS-2010 EV (Shimadzu) с одним квадруполем (шприцевый ввод, использованы растворы образцов в MeOH–MeCN при расходе 60 мкл/мин, элюент

Схема 1



MeCN–H₂O, 95:5) в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов при потенциале капилляра 4.5 и –3.5 кВ соответственно. Температура капилляра интерфейса 250 °С, напряжение на капилляре интерфейса 25 ÷ –25 В. Скорость потока распыляющего газа (N₂) 1.5 л/мин. Напряжение на высокочастотных линзах (Q-agray) 5 ÷ –5 В. Хроматографический анализ проведен на хроматографе Younglin, колонка Wakosil C18RS 250 × 4.6 мм, 5 мкм (SGE), температура 23±2 °С. В качестве подвижной фазы использован элюент MeCN–H₂O, 10:90. Детектирование в УФ свете при длине волны 215 нм. Препаративное разделение продуктов проведено на приборе Shimadzu LC-20 со спектрофотометрическим диодно-матричным детектором, колонка Luna C18 250 × 10 мм; 10 мкм (Phenomenex). В качестве подвижной фазы использован элюент MeCN–H₂O, 10:90, скорость потока 4 мл/мин. Детектирование в УФ свете при длине волны 215 нм. УФ спектры записаны в диапазоне 195–400 нм при прохождении веществ через ячейку детектора во время хроматографического анализа.

1,4-Диоксан (субстрат окисления и одновременно растворитель), хлорбензол и 2,2'-азобисизобутиронитрил очищены по литературным методикам^{5,18}. Критерий чистоты субстрата – параметр его окисляемости.¹⁸ 5-Амино-6-метилурацил (**1**) получен по методике²⁴. По данным ВЭЖХ, вещество является индивидуальным, степень чистоты не менее 95%.

Методика окисления 5-амино-6-метилурацила (**1**).

В стеклянный реактор вносят 127 мл 1,4-диоксана, содержащего 50.0 мг (0.35 ммоль) 5-амино-6-метилурацила (**1**), и раствор 248.0 мг (1.50 ммоль) 2,2'-азобисизобутиронитрила в 12.6 мл 1,4-диоксана. Окисление проводят при температуре 60 °С в течение 225 мин при постоянном перемешивании и барботаже воздухом до полного расходования соединения **1**, за концентрацией которого следят методом спектрофотометрии при длине волны 290 нм. Из реакционной смеси в вакууме удаляют 1,4-диоксан, остаток промывают горячим PhH (5 × 3 мл) для удаления 2,2'-азобисизобутиронитрила и продуктов окисления 1,4-диоксана. Получают 44.2 мг смеси продуктов окисления, которые разделяют при помощи ВЭЖХ.

5,5,6-Тригидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4-(1*H*,3*H*)-дион (2). Выход 25%.^{*} Белые кристаллы, т. пл. 122–123 °С.^{17,21} УФ спектр, λ_{\max} , нм: 203. Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 19.9 (CH₃); 83.2 (C-6); 88.4 (C-5); 151.8 (C-2); 172.9 (C-4). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 215 [M+K]⁺ (0.4).

6-Гидрокси-6-метилдигидропиримидин-2,4,5(3*H*)-трион (3). Выход 18%. Белые кристаллы.^{17,21} УФ спектр, λ_{\max} , нм: 210. Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 25.7 (CH₃); 86.9

* Выход рассчитывали по отношению к количеству выделенной смеси продуктов окисления (44.2 мг). Часть выделенных фракций (17 мг) представляла собой смесь соединений **2**, **3** и **4**, а также продуктов их распада.

(C-6); 157.0 (C-2); 174.7 (C-4); 207.0 (C-5). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 197 [M+K]⁺ (1).

6-Гидрокси-5-гидроксимино-6-метилдигидро-пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (4). Выход 18%, бледно-желтый кристаллический порошок, т. пл. 136 °С (с разл.). УФ спектр, λ_{max} , нм: 208, 274. Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д.: 2.16 (3H, с, CH₃); 5.43 (1H, уш. с, 1-NH); 8.46 (2H, уш. с, 2OH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м. д.: 20.8 (CH₃); 94.7 (C-6); 152.0 (C-4); 153.9 (C-5); 160.7 (C-2). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 230 [M+K+H₂O]⁺ (61).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-03-31377).

Хроматографические анализы и анализы методом ЯМР ¹³C выполнены на оборудовании ЦКП "Химия" ИОХ УНЦ РАН.

Список литературы

- Gerchikov, A. Ya.; Garifullina, G. G.; Sultanaeva, I. V.; Krivonogov, V. P.; Mustafin, A. G.; Abdrakhmanov, I. B. *Pharm. Chem. J.* **2000**, 34, 543. [*Хим.-фарм. журн.* **2000**, 34(10), 28.]
- Dautova, I. F.; Akhatova, G. R.; Safarova, I. V.; Gerchikov, A. Ya.; Khursan, S. L. *Dokl. Chem.* **2010**, 431(2), 99. [*Докл. АН* **2010**, 431, 487.]
- Grabovskiy, S. A.; Murinov, Y. I.; Kabalnova, N. N. *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 2389.
- Akhatova, G. R.; Safarova, I. V.; Gerchikov, A. Ya. *Kinet. Catal.* **2011**, 52, 1. [*Кинетика и катализ* **2011**, 52, 3.]
- Yakupova, L. R.; Sakhautdinova, R. A.; Pankratyev, E. Yu.; Safiullin, R. L. *Kinet. Catal.* **2012**, 53, 665. [*Кинетика и катализ* **2012**, 53, 708.]
- Мышкин, В. А.; Бакиров, А. Б. *Оксиметилурацил (Очерки экспериментальной фармакологии)*, Уфа, 2001, с. 45.
- Amorati, R.; Valgimigli, L.; Pedulli, G. F.; Grabovskiy, S. A.; Kabal'nova, N. N.; Chatgialioglu, C. *Org. Lett.* **2010**, 12, 4130.
- Камилов, Ф. Х.; Лазарева, Д. Н.; Плечев, В. В. *Пиримидины и их применение в медицине*, БГМИ: Уфа, 1992, с. 85.
- Yakupova, L. R.; Sakhautdinova, R. A.; Fattakhov, A. Kh.; Gimadieva, A. R.; Safiullin, R. L. *Kinet. Catal.* **2013**, 54, 279. [*Кинетика и катализ* **2013**, 54, 291.]
- Grabovskiy, S. A.; Konkina, I. G.; Murinov, Yu. I.; Kabal'nova, N. N. *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 1447.
- Mori, M.; Teshima, S.-I.; Yoshimoto, H.; Fujita, S.-I.; Taniguchi, R.; Hatta, H.; Nishimoto, S.-I. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, 105, 2070.
- Schuchmann, M. N.; Von Sonntag, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 1525.
- Wagner, J. R.; Decarroz, C.; Berger, M.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4101.
- Wagner, J. R.; Cadet, J. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 564.
- Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. *FASEB J.* **2003**, 17, 1195.
- Martini, M.; Termini, J. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 234.
- Kabalnova, N. N.; Grabovskiy, S. A.; Nugumanov, T. R.; Ivanov, S. P.; Murinov, Yu. I. *Russ. Chem. Bull.* **2008**, 57, 2265. [*Изв. АН, Сер. хим.* **2008**, 2223.]
- Yakupova, L. R.; Khairullina, V. R.; Gerchikov, A. Ya.; Safiullin, R. L.; Vaimuratova, G. R. *Kinet. Catal.* **2008**, 49, 366. [*Кинетика и катализ* **2008**, 49, 387.]
- Денисов, Е. Т.; Мицкевич, Н. И.; Агабеков, В. Е. *Механизм жидкофазного окисления кислородсодержащих соединений*, Наука и техника: Минск, 1975, с. 174.
- Rivière, J.; Bergeron, F.; Tremblay, S.; Gasparutto, D.; Cadet, J.; Wagner, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6548.
- <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (Predicted NMR data calculated using Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) Software V11.01 (© 1994–2015 ACD/Labs))
- Simandan, T.; Sun, J.; Dix, T. A. *Biochem. J.* **1998**, 335, 233.
- Neta, P. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2399.
- Мустафин, А. Г.; Гимадиева, А. Р.; Чернышенко, Ю. Н.; Фаттахов, А. Х.; Абдрахманов, И. Б. РФ патент 2417991.