

УДК 577.152.3

ДИАЦЕТИЛФЛУОРЕСЦЕИН КАК ФЛУОРОГЕННЫЙ СУБСТРАТ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

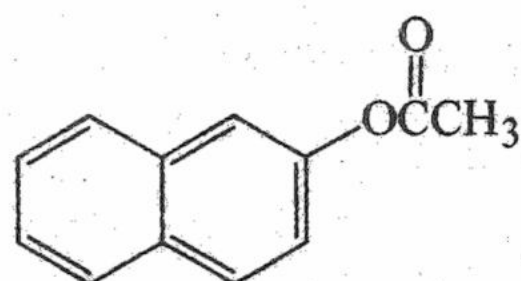
© 2000 С.В.Малёванный*, Н.А.Водолазкая, Н.О.Мчедлов-Петросян, В.Д.Орлов

Изучена кинетика гидролиза диацетата флуоресцеина (ДАФ) в мицеллярной среде в присутствии бутирилхолинэстеразы (ХЭ) (ХЭ, КФ 3.1.1.8). Рассчитаны значения максимальной скорости и константы Михаэлиса ферментативного гидролиза для данного субстрата. Предложен метод работы с ограниченно растворимыми субстратами, основывающийся на использовании поверхностно-активных веществ (ПАВ). Выбран pH-оптимум ферментативного гидролиза ДАФ.

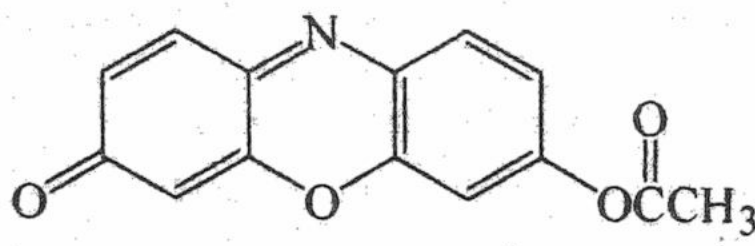
В настоящее время для определения активности различных ферментов все чаще используются хромогенные и флуорогенные субстраты, окраска которых отличается от окраски продуктов их превращения [1-6]. Особый интерес представляют флуорогенные субстраты, так как флуориметрия по сравнению с фотометрией имеет ряд важных преимуществ [7]:

- а) этот метод более чувствителен; пределы обнаружения ниже в 100 – 1000 раз;
- б) зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации линейны в гораздо более широком диапазоне ($10^{-7} \div 10^{-4}$ моль/л) [8], что позволяет исключить операцию разбавления пробы;
- в) влияние температуры “самокомпенсируется”, так как с ее увеличением скорость реакции растет, а квантовый выход флуоресценции уменьшается.

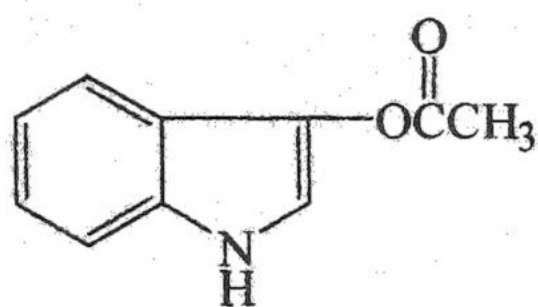
Ранее [5,9] в качестве субстратов холинэстеразы (ХЭ) рассматривались ацетатные и бутиратные эфиры β -нафтола, 2,3-дицианохинона, резорфина, индоксила, 4-метилумбеллиферона:



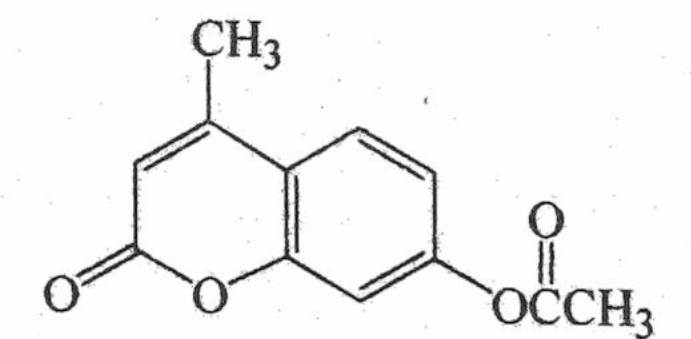
β -нафтилацетат



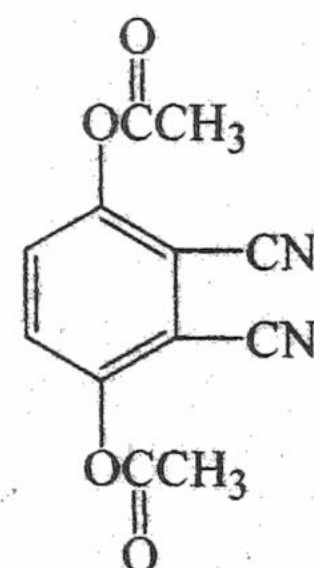
ацетилрезорурфин



индоксилацетат



4-метилумбеллиферилацетат



диацетат 2,3-дицианохинона

Однако каждому из приведенных выше веществ присущи те или иные недостатки, ограничивающие их применение:

- нестойкость при хранении;
- слабая флуоресценция;
- малая доступность;
- разложение продуктов гидролиза.

Поэтому в качестве исследуемого субстрата мы выбрали диацетат флуоресцеина (ДАФ) так как:

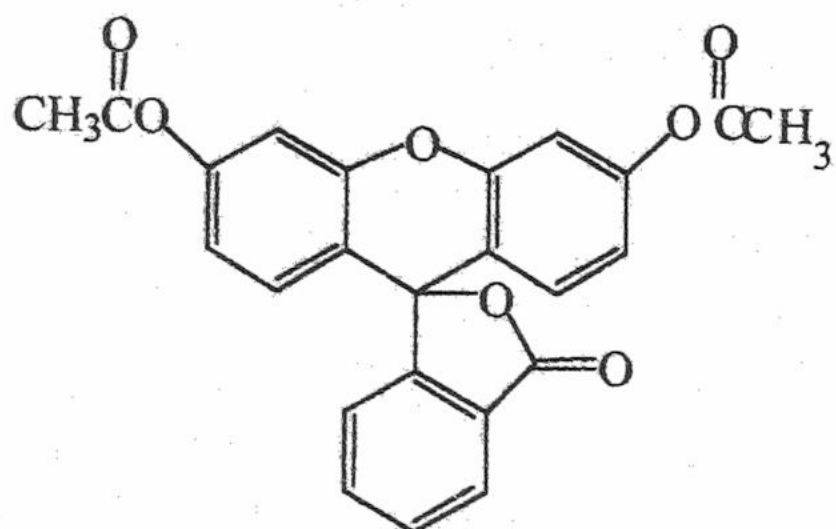
- его синтез довольно прост [10];

* Харьковский военный университет

— у продукта его гидролиза — флуоресцеина — в щелочной среде высокий квантовый выход (0.97) и высокая чувствительность при обнаружении (определяется при разбавлении 1:40000000) [11];

— максимальная интенсивность флуоресценции образующегося в процессе гидролиза флуоресцеина проявляется при значениях pH [12], близких к оптимуму ферментативной активности ХЭ [13], то есть ни в процессе реакции, ни после ее завершения продукты не нуждаются в дополнительном проявлении.

В 1964 г. Ж. Гильбот и Д. Креймер показали [14], что гидролиз ДАФ катализируется



Диацетат флуоресцеина (ДАФ)

различными ферментами (липаза, ацилаза, α - и γ -химотрипсин). Во время определения их активности наличие в растворе других гидролаз, в том числе и ХЭ, не влияло на гидролиз субстрата.

Вероятно, метилцеллозольв, который использовался для повышения растворимости ДАФ, ингибировал ферментативную активность ХЭ [15].

Настоящая работа посвящена изучению гидролиза ДАФ под действием ХЭ с целью разработки более чувствительного метода определения активности данного фермента.

Экспериментальная часть

Реагенты. В качестве фермента использовали препарат ХЭ (ХЭ, КФ 3.1.1.8) сыворотки крови лошади (НПО «Биомед», Пермь) с удельной активностью 15 АЕ/мг.

ДАФ был синтезирован Б.В.Папоновым на кафедре органической химии ХНУ им. В.Н.Каразина ацилированием флуоресцеина согласно стандартной методике [10], температура плавления полученного вещества равнялась 203 °С, что хорошо согласуется с литературными данными [16].

Для приготовления буферных растворов использовали ТРИС (2-амино-2-гидроксиметил)-1,3-пропандиол), тетраборат натрия, хлорид натрия, хлороводородную и фосфорную кислоты квалификации «хч», раствор NaOH, защищенный от CO₂. Органические растворители — метанол и ацетон — были предварительно перегнаны. Использовали следующие препараты ПАВ (производства фирмы Sigma): N-цетил-N,N-диметиламмоний пропансульфонат (ЦДАПС) — C₁₆H₃₃N[⊕](CH₃)₂(CH₂)₃SO₃[⊖], N-цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) — C₁₆H₃₃N[⊕]C₅H₅Cl[⊖], цетилтриметиламмоний хлорид (ЦТАХ) — C₁₆H₃₃N[⊕](CH₃)₃Cl[⊖], додецилсульфат натрия (ДСН) — C₁₂H₂₅SO₄[⊖]Na[⊕], Тритон X-100 — (CH₃)₃CCN₂C(CH₃)₂C₆H₄O(CH₂CH₂O)₉₋₁₀H.

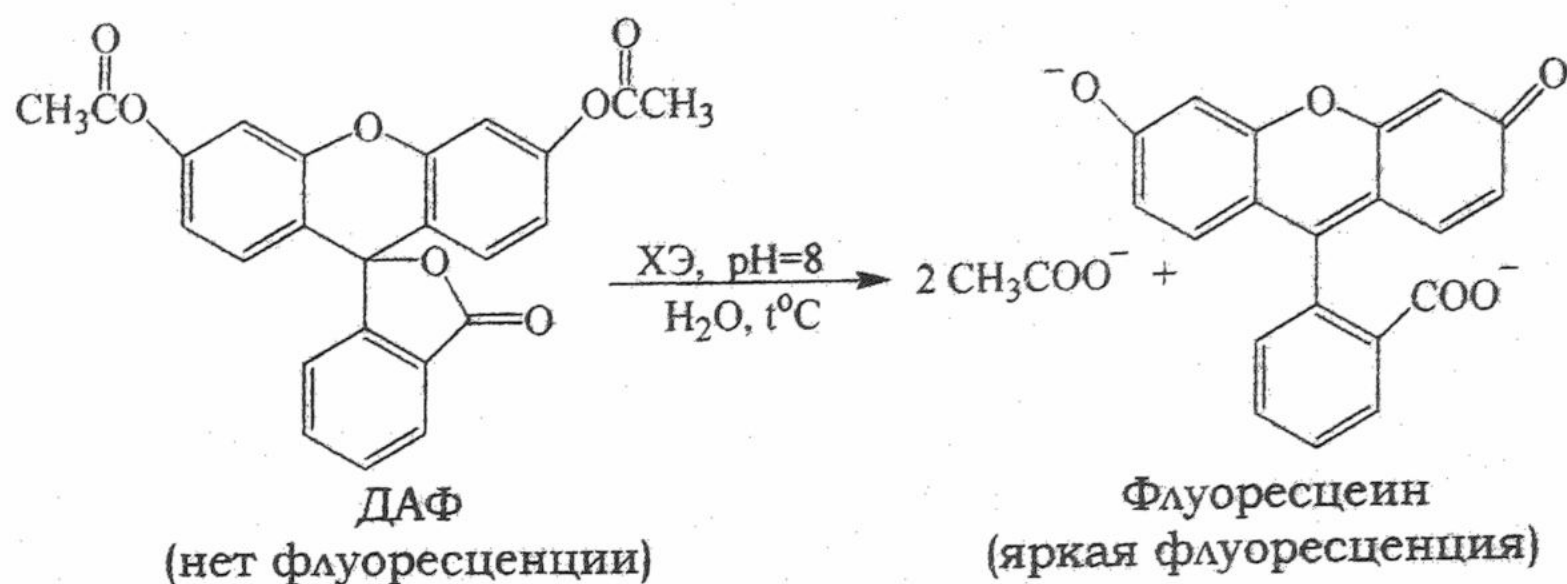
В качестве ингибитора ХЭ использовали растворы прозерина (N-(метадиметилкарбамоилоксифенил)-триметиламмоний метилсульфат).

Приборы. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометрах СФ-46 (ЛОМО) и Hitachi U-3210, а испускания — на спектрофлуориметре Hitachi F-4010. Авторы выражают благодарность А.О.Дорошенко (НИИ химии при ХНУ им. В.Н.Каразина) за предоставление возможности измерений.

Методика

2 мл раствора субстрата (C ≈ 8 × 10⁻⁶ моль/л), солюбилизированного в растворе цвиттерионного ПАВ — ЦДАПС (C = 1.5 × 10⁻³ моль/л), термостатировали (t = 37 °С) в течение 3 минут в кварцевой кювете (l = 1 см) и добавляли 1 мл боратного буферного раствора pH = 8.0 [17], ионная сила 0.05 моль/л, с содержанием ХЭ 0.1 ÷ 1.5 мг/мл. Измерение флуоресценции проводилось автоматически через 0.5 сек. в течение 5 мин при $\lambda_{\max}^{abs} = 495$ нм и $\lambda_{\max}^{em} = 516$ нм. Значения λ_{\max} поглощения и флуоресценции в мицеллярной среде не совпадают с таковыми для водного раствора флуоресцеина ($\lambda_{\max}^{abs} = 491$ нм и $\lambda_{\max}^{em} = 513$ нм) вследствие связывания продуктов гидролиза мицеллами цвиттерионного ПАВ.

Увеличение интенсивности флуоресценции (F) обусловлено накоплением флуоресцеина в процессе ферментативного гидролиза субстрата. В ходе эксперимента наблюдалась прямолинейная зависимость значений F от времени.



Результаты и обсуждение

Растворение субстрата. В ходе предварительных опытов ДАФ, ввиду его низкой растворимости в воде, растворяли в органических растворителях (метанол, спирто-ацетоновая смесь), однако при последующем разбавлении в буферных растворах с содержанием органических растворителей не более 2% наблюдалась опалесценция, что не удовлетворяло требованиям эксперимента. Поэтому была предпринята попытка использовать в качестве солюбилизаторов мицеллярные растворы ПАВ различных типов. В ходе исследования было обнаружено следующее:

- мицеллы неионных ПАВ (НПАВ) и анионных ПАВ (АПАВ) ингибировали как самопроизвольный гидролиз, так и ферментативный;

- ингибирующее действие цвиттерионного ПАВ (ЦПАВ) было существенно меньше, чем в случае НПАВ и АПАВ, растворимость субстрата была удовлетворительной (порядка 10^{-5} моль/л), а доля самопроизвольного гидролиза в рабочих буферных растворах не превышала 5%;

- в мицеллах катионных ПАВ (КПАВ) растворимость субстрата выше, чем в растворах ПАВ других типов, однако доля скорости самопроизвольного гидролиза при оптимальных значениях pH для XЭ и флуоресценции продуктов гидролиза была слишком большой.

На основании вышеизложенного в качестве солюбилизатора ДАФ использовали мицеллярные растворы цвиттерионного ПАВ. Концентрацию растворенного субстрата определяли спектрофотометрически, после полного щелочного гидролиза, используя экспериментально найденную величину коэффициента молярного поглощения дианиона флуоресцеина в мицеллярном растворе ($C_{\text{ПАВ}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М), которая составила $\epsilon = 78440 \text{ см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{л}$.

Выбор оптимальных условий ферментативного гидролиза ДАФ. Активность XЭ зависит от pH среды. Важно подчеркнуть, что оптимальная область значений pH, при которых активность каталитического центра XЭ максимальна [15], совпадает с областью pH максимальной флуоресценции продукта гидролиза исследуемого субстрата (pH = 8 ÷ 10) [11]. Однако опыты показали, что наиболее подходящим является pH 8.0 (при температуре 37°C), так как с возрастанием основности среды увеличивается скорость самопроизвольного гидролиза субстрата.

Нами было изучено влияние природы буфера на скорость ферментативного гидролиза (ν). При использовании фосфатных, боратных и ТРИС буферных растворов было выявлено, что наиболее подходящей средой для протекания ферментативного гидролиза является боратный буферный раствор с ионной силой 0.05 моль/л, ввиду высокого значения скорости ферментативного гидролиза и низкой доли самопроизвольного гидролиза субстрата. Обнаружено симбатное изменение величин ν и ионной силы буферного раствора.

Между концентрацией ЦДАПС и растворимостью субстрата, а также между концентрацией ДАФ и ν в интервале $(0.3 - 1.5) \cdot 10^{-6}$ моль/л наблюдаются линейные зависимости. Однако варьировать концентрацию субстрата можно, лишь изменяя концентрацию ЦДАПС. При этом было выявлено, что увеличение содержания ПАВ не оказывает существенного влияния на ν .

Кинетика ферментативного гидролиза. Установлена прямая зависимость между скоростью ферментативного гидролиза и концентрацией ХЭ (рис.1), что хорошо согласуется с литературными данными [13,15]. Это позволяет определять по градуировочному графику содержание фермента или его активность в исследуемой пробе.

Низкая растворимость ДАФ ограничивает диапазон доступных для исследования концентраций субстрата. Экспериментальные данные (рис. 2) могут быть описаны уравнением Михаэлиса – Ментен:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}, \quad (1)$$

где v – скорость ферментативной реакции, моль/мин; $[S]$ – концентрация субстрата, моль/л; V – максимальная скорость ферментативной реакции, моль/мин; K_m – константа Михаэлиса, моль/л.

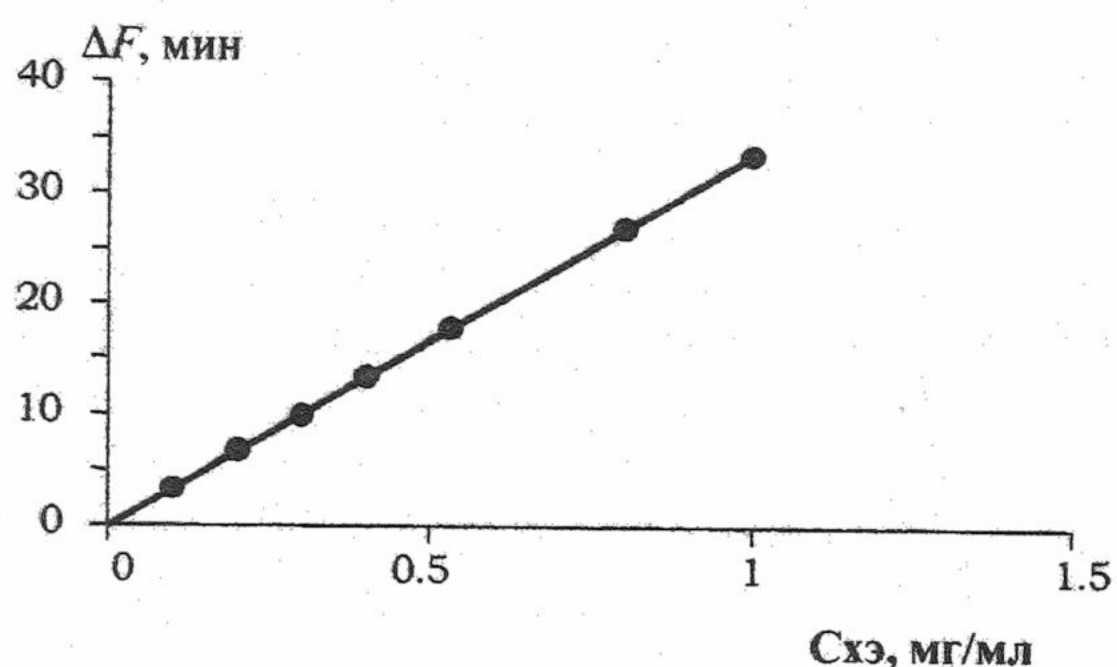


Рис.1. Зависимость скорости ферментативного гидролиза ДАФ от концентрации ХЭ

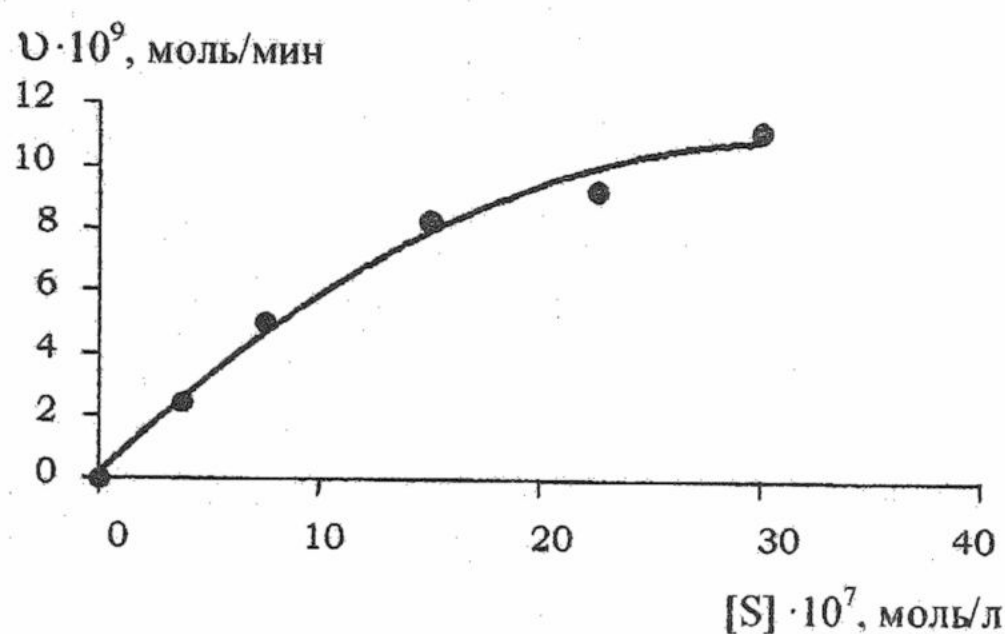


Рис.2. Зависимость скорости ферментативного гидролиза от концентрации ДАФ

Легко видеть, что область линейности отвечает условию $[S] \ll K_m$. Представленная на рис.2 зависимость v от $[S]$ позволяет определить значения K_m и V . Однако чаще предпочитают строить более наглядный график, согласно линеаризованному уравнению Михаэлиса – Ментен (2):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]}. \quad (2)$$

Таким образом, график в координатах $1/v$ — $1/[S]$ дает прямую, наклон которой равен K_m/V , а пересечение с осью ординат соответствует $1/V$ (рис.3).

Из данной зависимости были рассчитаны значения V и K_m для ДАФ, равные $(2.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$ моль/мин и $(3.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-6}$ моль/л соответственно.

Ингибирование. Первым антихолинэстеразным веществом, открытым вместе с ХЭ [18,19], был эзерин (физостигмин) – алкалоид из калабарских бобов, который можно рассматривать как метилкарбаминоэфир замещенного фенола. Более широкое применение, в том числе и в аналитических целях [20], нашел его синтетический аналог – прозерин (простигмин, неостигмин). Эзерин и прозерин, как и все аналогичные карбаматы, длительное время относили к обратимым ингибиторам ХЭ. Позже было найдено, что они сравнительно медленно взаимодействуют с ферментом подобно необратимым фосфорорганическим ингибиторам [21,22,23]. Поэтому нами было исследовано влияние прозерина на ферментативную активность ХЭ.

При концентрациях прозерина порядка 10^{-6} моль/л наблюдается линейная зависимость между концентрацией ингибитора и v (время инкубации 1 минута) (рис.4). Это дает возможность определять концентрацию ингибитора в исследуемой пробе при помощи градуировочного графика.

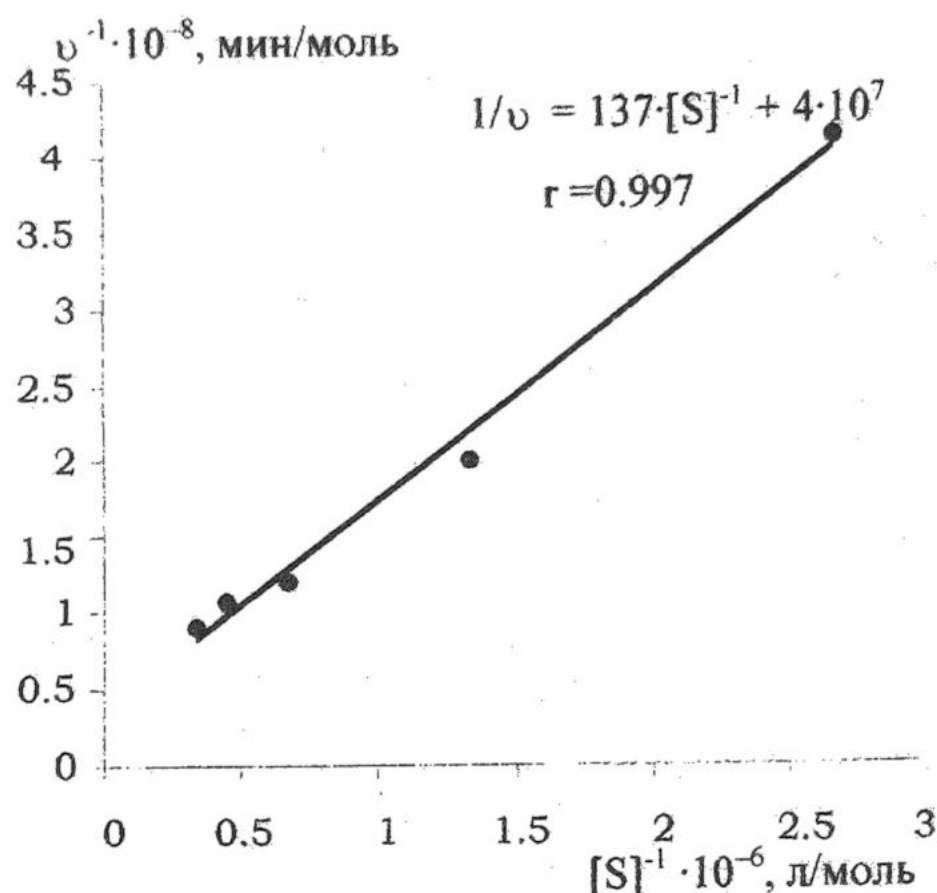


Рис.3. Зависимость скорости ферментативного гидролиза от концентрации ДАФ

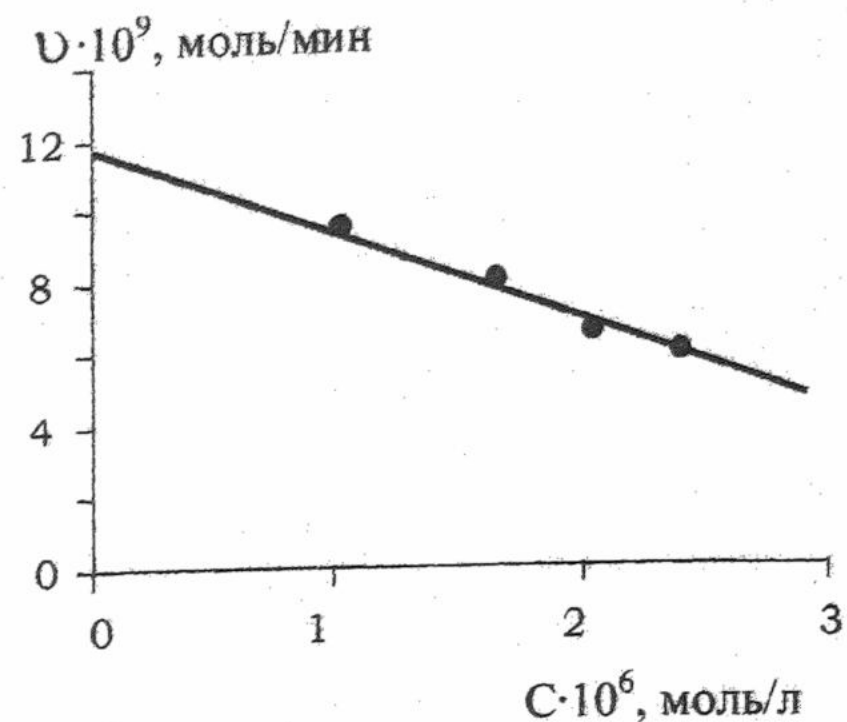
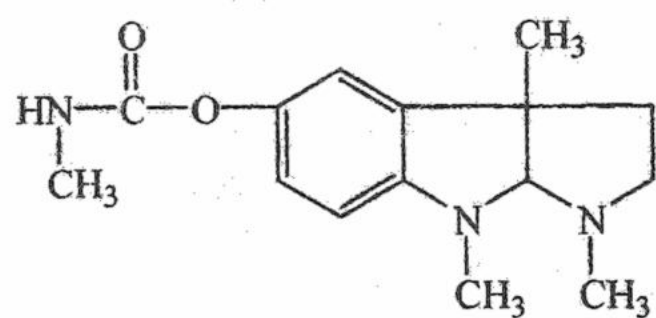
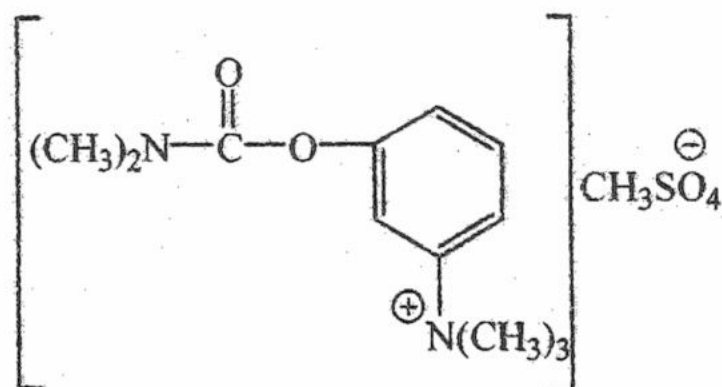


Рис.4. Зависимость скорости ферментативного гидролиза от концентрации ингибитора

Преимущества использования ДАФ в качестве субстрата ХЭ по сравнению с обычными фотометрическими методиками определения активности фермента очевидны. Из флуорогенных методов определения ферментативной активности наиболее изученным является запатентованный американскими исследователями Ж.Гильботом и Д.Креймером [5], где в качестве субстратов применялись ацетилиндоксил и бутирилрезорурфин. Если в качестве критерия чувствительности взять зависимость нарастания флуоресценции от количества фермента (с учетом его активности) за единицу времени ($\Delta F / [C_{ХЭ} \times \Delta \tau]$), то ДАФ в зависимости от условий определения позволяет в 1.5 ÷ 3 раза повысить чувствительность анализа по сравнению с вышеупомянутым методом.



Эзерин



Прозерин

Дальнейшие исследования должны выяснить, обусловлено ли влияние ПАВ одной лишь соллюбилизацией ДАФ и продуктов его гидролиза, или ЦДАПС воздействует как на белковую макромолекулу в целом, так и на каталитический центр. Наконец, играют ли какую-либо роль в таком воздействии мицеллы ЦДАПС, или одни только мономеры ПАВ. Ассоциация алкиламмониевой группировки ЦПАВ с «анионным центром» ХЭ может повышать гидрофобность окружения каталитического центра за счет длинного углеводородного радикала ПАВ, и тем самым облегчить связывание и ориентацию субстрата.

С «анионным центром» ХЭ субстрат ДАФ, вероятно, не взаимодействует, так как предварительные данные исследования ингибирующего воздействия прозерина, обработанные по методу Диксона, свидетельствуют о неконкурентном характере ингибирования. Все данные, полученные до настоящего времени о типе ингибирования прозеринном ХЭ с использованием в качестве субстрата ацетилхолина (АХ), свидетельствуют как раз о конкурентном характере ингибирования. Это хорошо объяснялось структурным подобием прозерина и АХ $CH_3C(O)OC_2H_4N^+(CH_3)_3$. Основная роль в этом подобии, согласно полученным нами результатам, отводится четвертичному атому азота. В молекуле ДАФ нет такого катионного участка, который мог бы взаимодействовать с анионным центром ХЭ. В этом случае нет конкуренции между субстратом и ингибитором. Присоединение прозерина не изменяет сродство фермента к ДАФ, но препятствует образованию продуктов. Бо-

лее подробная информация по этому вопросу будет дана в наших последующих публикациях.

Перспективы дальнейшего совершенствования методов определения активности ХЭ заключаются в исследовании влияния ПАВ на ферментативную реакцию гидролиза и в изучении бутирилфлуоресцеина как более перспективного флуорогенного субстрата [24].

Литература

1. Позднев В.Ф., Планутис К.С., Точилкин А.И. Биоорганическая химия. 1991. Т.17. №10. С.1347-1351.
2. Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях. Рига: РМИ. 1986. 263 с.
3. Биотехнология. Кн. 8. М.: Высш. школа. 1987. 144 с.
4. Методы определения микроколичеств пестицидов. М.: Медицина. 1984. 255 с.
5. Патент США. 3378463. 1968
6. Справочник биохимика. М.: Мир. 1991. 543 с.
7. Перес-Бендито Д., Сильва М. Кинетические методы в аналитической химии. М.: Мир. 1991. 395 с.
8. Гайдукевич О.М., Болотов В.В. Аналітична хімія. Х.: Основа. 2000. 328 с.
9. Jacks T.J., Kircher H.W. Anal. Biochem. 1967. V.21. P.279-285.
10. Методы получения химических реактивов и препаратов. Выпуск 14. М.: ИРЕА. 1966. 163 с.
11. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. М.: Химия. 1984. 334 с.
12. Rozwadowski M. Acta Physica Polonica. 1961. V.20. P.1005-1017.
13. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстераза и антихолинэстеразные вещества. Л.: Медицина. 1964. 382 с.
14. Guilbault G.G., Kramer D.N. Anal. Chem. 1964. V.36. P.409-412.
15. Садыков А.С. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент. Фан. 1976. 206 с.
16. Guilbault G.G., Kramer D.N. Anal. Biochem. 1966. V.14. P.28-40.
17. Бейтс Р. Определение рН. Теория и практика. Л.: Химия. 1968. 398 с.
18. Loewi O., Navratil E. Pflüger's Arch. 1926. V.214. No.5-6. P.678.
19. Engelhardt E., Loewi O. Arch. exp. Path. a. Pharmac. 1930. V.150. P.1.
20. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина. 1987. 364 с.
21. Myers D.K., Kemp A. Nature. 1954. 173. P.33-34.
22. Augustinsson K.B. et al. Biochem. Pharmacol. 1959. V.3. P.68.
23. Wilson I.B., Hatch M.A., Ginsburg S. J. Biol. Chem. 1960. V.235. P.2312.
24. Бресткин А.П., Кабачник М.И., Розенгарт Е.В. Доклады АН СССР. 1984. Т.274. №4. С.960-965.

Поступила в редакцию 30 октября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). S.V.Malevaniy, N.A.Vodolazkaya, N.O.Mchedlov-Petrosyan, V.D.Orlov. Diacetyl fluorescein as a fluorogenic substrate of cholinesterase.

The kinetics of diacetylfluorescein hydrolysis in micellar medium in the presence of butyrylcholinesterase (KF 3.1.1.8) has been studied. The values of the maximal velocity and of Michaelis constant of fermentative hydrolysis of the given substrate have been estimated. A method for sparingly soluble substrates is proposed, based on using the surfactants. The optimal pH value for fermentative hydrolysis of diacetylfluorescein is offered.

УДК 543: 544.42:547. 281.1.

РАЗРАБОТКА И ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ

© 2000 О.Г.Маслий, В.А.Науменко, Н.Г.Сабо*, Л.Л.Михальская *

Дисперсионный анализ стадий методики показал, что стадия пробоотбора может существенно повлиять на окончательные выводы, сделанные по результатам анализа, особенно если измеренное значение находится вблизи браковочной границы (ПДК). Очевидно, алгоритм методики анализа должен регламентировать и методику пробоотбора воды из водоемов. Разработана жидкостно-хроматографическая методика определения формальдегида в воде водоемов в интервале содержаний от 0.4 до 10 ПДК, нижний предел обнаружения с вероятностью 0.95 составляет 0.020 мг/л. Границы доверительного интервала ± 0.003 мг/л; относительное стандартное отклонение $s_r=0.001$ (в середине градуировочной зависимости).

При разработке и использовании химико-аналитической методики оправданно стремятся к уменьшению погрешности результата анализа. Один из путей достижения этой цели – выявление стадии методики, дающей наибольший вклад в общую погрешность, и сведение к минимуму погрешностей данной стадии оптимизацией алгоритма методики. Для этого применяют методы математической статистики, в частности, достаточно эффективным оказывается метод дисперсионного анализа. При соответствующем планировании эксперимента он позволяет разделить суммарную дисперсию на дисперсии отдельных стадий анализа: пробоотбора, пробоподготовки, техники инструментального измерения и другие. [1]. Решение этой задачи является целью данной работы, выполненной на примере разработки и оптимизации методики определения малых количеств формальдегида.

Формальдегид – один из широко распространенных загрязнителей окружающей среды. Пути его попадания в среду обитания различны: естественные – продукты метаболизма организмов животного и растительного происхождения, и техногенные. Содержание его во всех сферах нормируется из-за высокой химической активности [2], так ПДК в водах водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения составляет 0.05 мг/л [3].

Существует несколько методик количественного измерения формальдегида в различных объектах [4-7], основанных на хроматографическом или спектрофотометрическом измерении окрашенных продуктов его реакции с производными гидразина [8] и включающих трудоемкую пробоподготовку, в частности, отгонку формальдегида.

Экспериментальная часть

Для определения формальдегида в водах поверхностных водоемов мы разработали методику, основанную на количественно протекающей реакции взаимодействия его с 2,4-динитрофенилгидразином с последующим количественным измерением продукта реакции методом жидкостной хроматографии с обращенными фазами. Наш выбор основан на том, что метод имеет широкий линейный диапазон градуировочного графика, низкий предел обнаружения и не требует предварительного отделения формальдегида. При определении низких концентраций последнего (на уровне ПДК) необходимо концентрирование пробы экстракцией [9].

Полученное соединение 2,4-динитрофенилгидразон формальдегида концентрируют из большого объема водной пробы количественной экстракцией в органический растворитель (в данном случае – гексан). При отгонке и последующем выпаривании гексана гидразон не улетучивается, сухой остаток хорошо растворяется в метаноле или ацетонитриле, раствор непосредственно пригоден для хроматографирования.

Разработку химико-аналитической методики начинают с предпоследней стадии – разработки алгоритма получения и измерения аналитического сигнала искомого компонента

* Харьковский научный центр военной экологии

в состоянии, в которое его переводят из пробы в процессе пробоподготовки. Эта стадия включает: обоснование и оптимизацию операций получения и измерения аналитических сигналов "холостого" и пробы; построение градуировочной зависимости; вычисление результата отдельного измерения. Последняя стадия – вычисление и оценка результата анализа [10].

Выбор оптимальных условий хроматографирования направлен на достижение высокой эффективности и селективности разделения компонентов и обеспечение высокой чувствительности детектора. Эти требования обусловили необходимость оптимизации следующих факторов: растворителя вводимой пробы и ее объема; подвижной фазы и скорости ее потока; неподвижной фазы; размеров и температуры колонки; типа детектора и режима его работы.

Спектрофотометрический детектор, которым оснащен жидкостный хроматограф НР-1050, подходит для решения данной аналитической задачи. Максимальная чувствительность детектора обеспечивается при измерении экстинкции в максимуме поглощения. На рис.1 представлены спектры поглощения 2,4-динитрофенилгидразина и 2,4-динитрофенилгидрозола формальдегида, из которых видно, что в максимуме поглощения гидразона поглощает и реактив, что делает затруднительным использование спектрофотометрического измерения без предварительного разделения этих веществ.

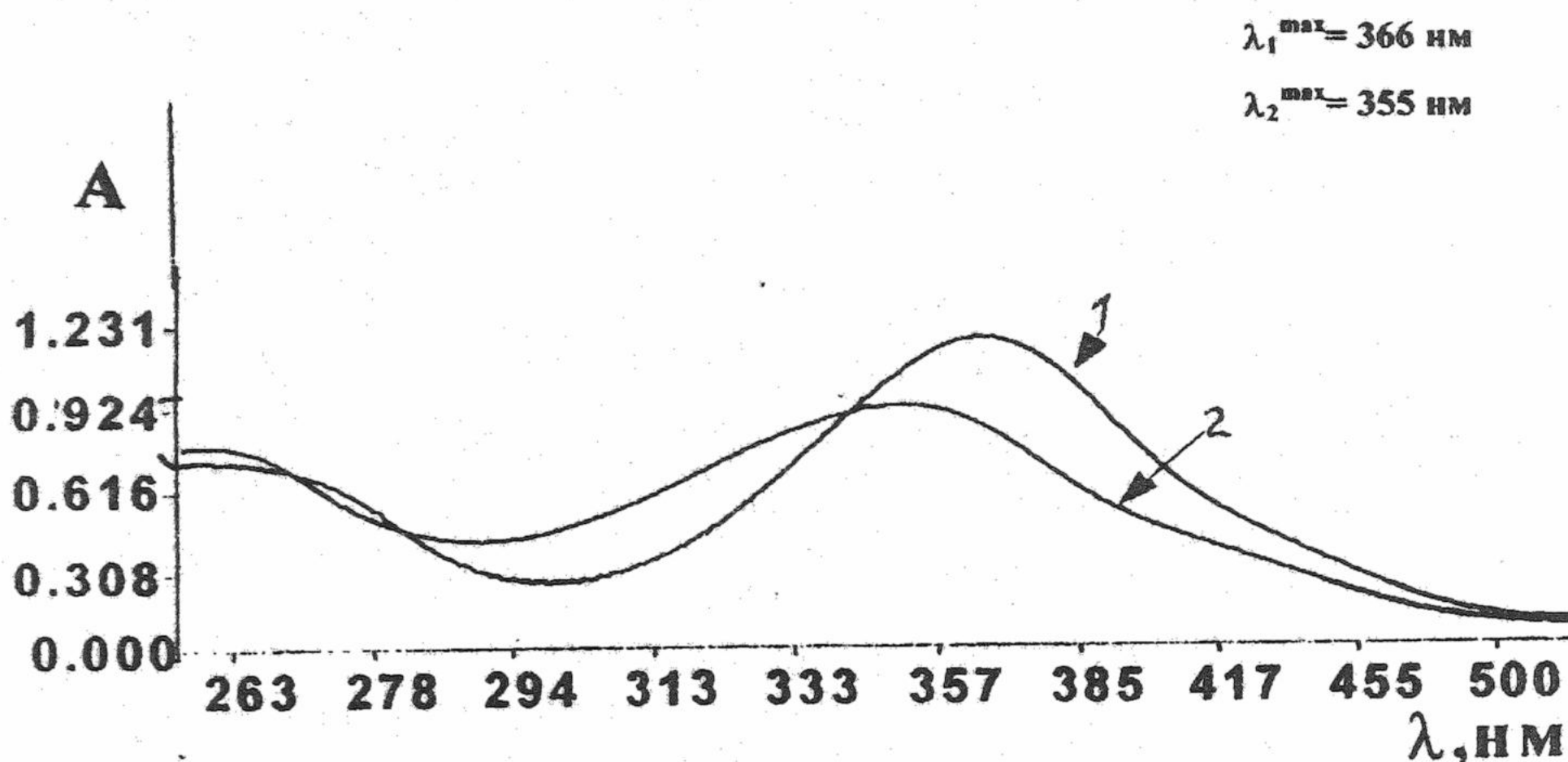


Рис.1. Спектры поглощения 2,4-динитрофенилгидразина (1) и 2,4-динитрофенилгидрозола формальдегида (2).

Для работы методом обращенно фазовой распределительной ВЭЖХ выбрали аналитическую колонку размером 200x4.6 мм с неполярной неподвижной фазой ODS Hypersil (5 мкм) – на силикагель привиты предельные углеводороды с длиной цепи C₁₈. Температура колонки 40 °С оказалось достаточной для оптимального разделения пиков компонентов вводимой пробы.

В качестве подвижной фазы (элюента) выбрали смесь полярных веществ ацетонитрила и воды (в объемных соотношениях 45:55 соответственно). Давление в системе 77 бар, оптимальная скорость потока подвижной фазы 1.00 мл/мин.

При данном выборе неподвижной фазы в методе обращено-фазовой ВЭЖХ растворитель вводимой пробы должен быть полярным и прозрачным при рабочей длине волны. Этим требованиям удовлетворяет метанол, который мы и использовали в качестве растворителя. Пробу объемом 10 мкл вводили пневматическим автосамплером, которым оснащен хроматограф.

Аналитический сигнал преобразовывался и обрабатывался НР-компьютером по программе НР ChemStation для жидкостной хроматографии.

Типичная интегрированная хроматограмма представлена на рис.2, где видно эффективное отделение пика 2,4-динитрофенилгидрозола формальдегида.

Для разработки алгоритма методики использовали серии модельных растворов формальдегида с известной концентрацией. Для их приготовления использовали ГСО или раствор, предварительно стандартизованный по аттестованной методике.

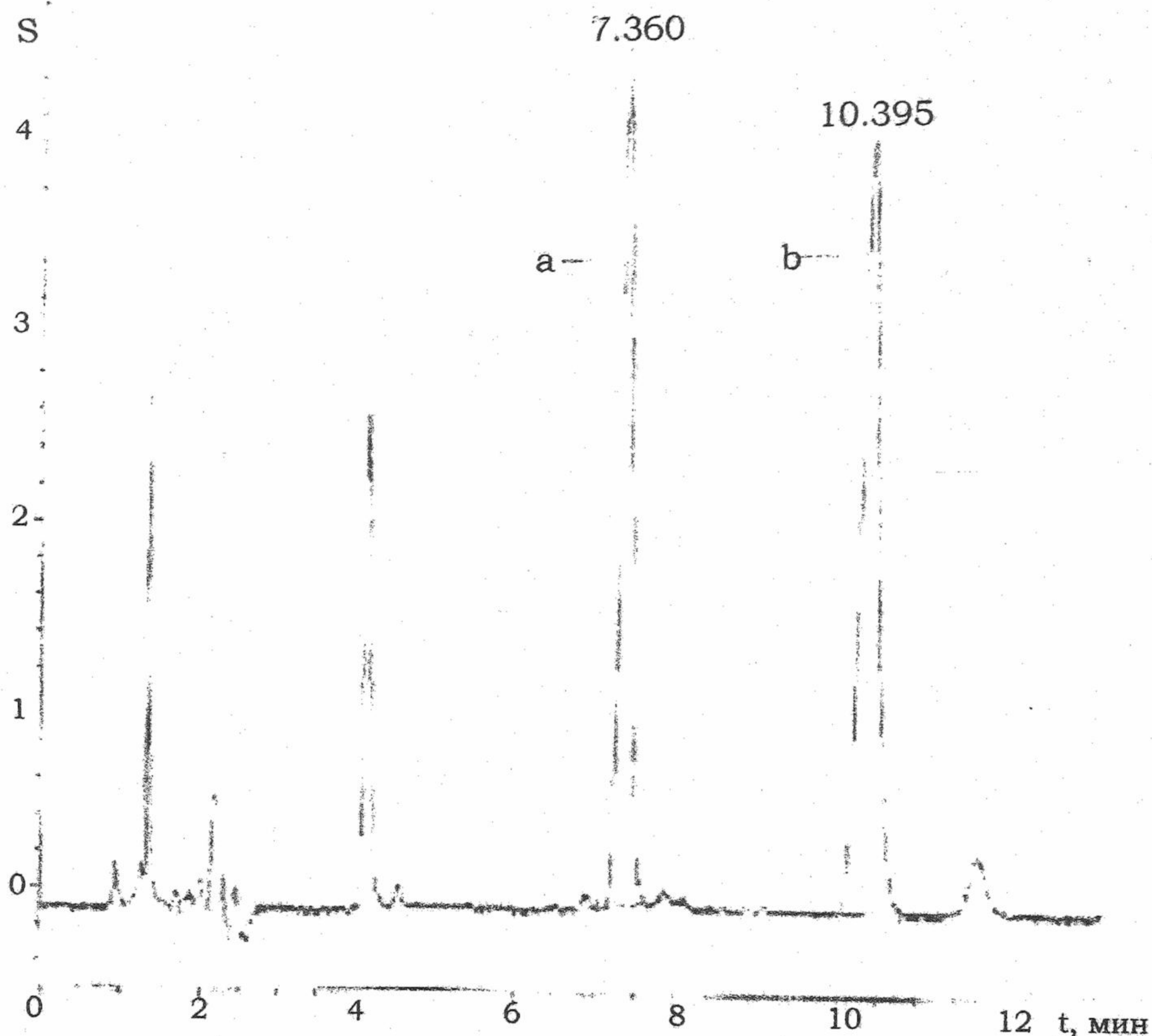


Рис.2. Интегрированная хроматограмма пробы: а — пик 2,4-динитрофенилгидразона формальдегида; б — пик 2,4-динитрофенилгидразина. Ось ординат градуирована в условных единицах площади пика; цифры над пиками — время удерживания компонента; в основании пиков — вспомогательные линии для интегрирования площадей пиков.

Для отработки алгоритма пробоподготовки проведены исследования зависимости величины аналитического сигнала (площади хроматографического пика) от рН водной фазы (пробы воды) при прочих фиксированных условиях: параметры хроматографирования, концентрации формальдегида в модельных растворах, время и объемы фаз при экстракции. Результаты представлены на рис.3. Таким образом, оптимальным является $\text{pH} \approx 1$, при этом значении рН величина аналитического сигнала максимальна и стабильна в течение длительного времени. На основании предварительных исследований разработали следующий оптимизированный алгоритм химико-аналитической методики.

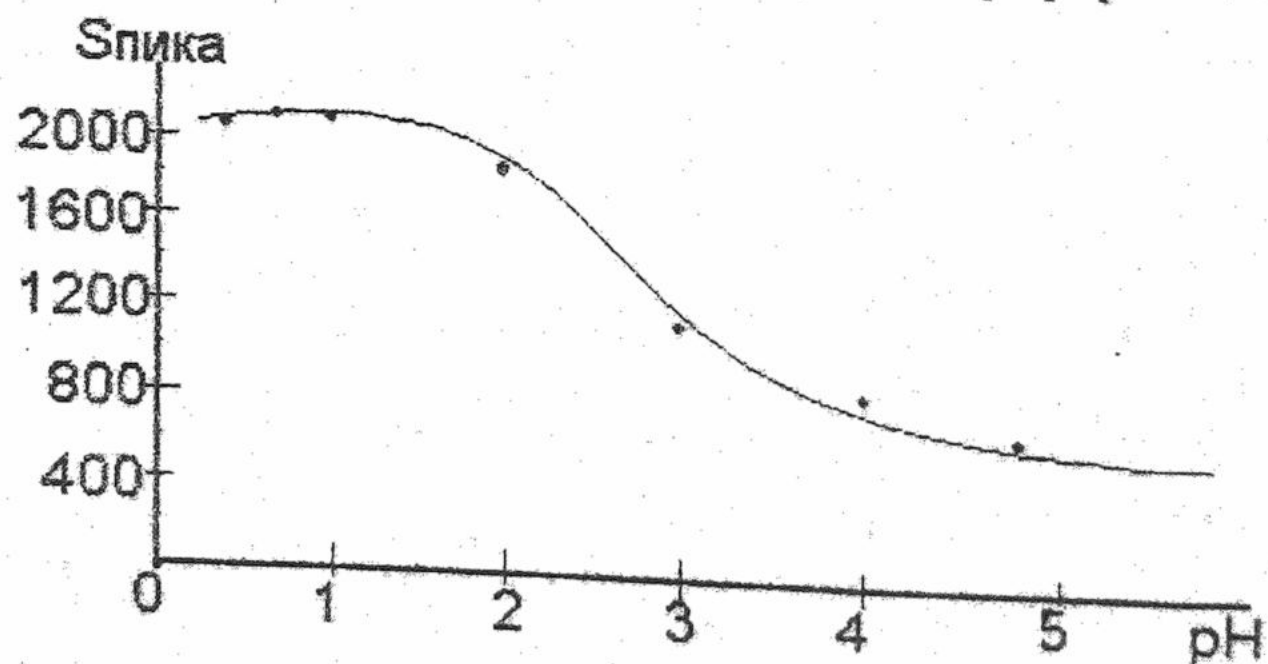


Рис.3. Зависимость величины аналитического сигнала от рН пробы.

Отобранную пробу воды доставляют в лабораторию, 25 мл анализируемой воды отбирают пипеткой в емкость для экстракции, добавляют 1.0 мл насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидрозина в хлороводородной кислоте с молярной концентрацией $c(\text{HCl}) = 2.0$ моль/л. В эту же емкость добавляют 2.5 мл гексана. Сосуд помещают на механический встряхиватель на 20 мин. Затем гексановый слой помещают в емкость для упаривания, подсушивают безводным сульфатом натрия и выпаривают досуха при температуре около 60 °С. Сухой остаток растворяют, добавляя пипеткой 1.0 мл метанола (концентрирование в 25 раз). Подготовленную таким образом пробу хроматографируют при выбранных условиях хроматографирования, записывают и интегрируют хроматограмму.

Для построения градуировочной зависимости из ГСО формальдегида разбавлением готовят исходный раствор с массовой концентрацией 2.00 мг/л, а из него – шесть градуировочных растворов с массовыми концентрациями формальдегида от 0.02 мг/л до 0.5 мг/л (интервал градуировки включает ПДК). Для приготовления градуировочных растворов и "холостого" опыта использовали бидистиллированную воду.

Градуировочная зависимость найдена на основании результатов хроматографирования пяти независимых серий из шести градуировочных растворов в диапазоне концентраций 0.02 – 0.6 мг/л, который включает значение ПДК.

По [11] использование β -критерия позволило принять гипотезу об отсутствии промахов во всем массиве экспериментальных данных, по критерию Кохрена проверена однородность дисперсий пяти серий.

Предположили, что уравнение функциональной зависимости имеет вид:

$$y = A + Bx$$

По методу наименьших квадратов и в соответствии с [10] вычислены параметры градуировочной зависимости вида $S = A + Bc$ и их среднеквадратические отклонения, где S – площадь хроматографического пика в условных единицах-импульсах; c – массовая концентрация формальдегида.

Оказалось, что параметр A статистически незначим. По F -критерию принята гипотеза о линейности градуировочной зависимости вида $S = Bc$.

Таким образом, формула для вычисления результата отдельного хроматографического измерения имеет вид: $c_x = S_x / 2248.9$ (среднеквадратическое отклонение $s_b = 45.4$; остаточная дисперсия градуировочной зависимости $s_o^2 = 196.8$; коэффициент корреляции $r = 0.99993$).

Аддитивная и мультипликативная составляющие систематической погрешности могут быть выявлены из опытов типа «введено-найдено». Мы провели серию таких опытов на семи искусственно приготовленных растворах формальдегида в природной воде, где предварительно было доказано отсутствие формальдегида. Интервал массовых концентраций формальдегида в искусственных смесях («введено») лежит в диапазоне градуировочного графика. После двухкратного хроматографирования каждого раствора был вычислен результат измерения («найдено») по градуировочной зависимости.

Предположили функциональную зависимость «найдено» Y от «введено» X :

$$Y_{ij} = a + bX_j,$$

где j – номер раствора, i – номер измерения j -го раствора.

По методу наименьших квадратов вычислены параметры a и b , которые статистически ($P=0.95$) не отличаются от теоретических 0 и 1, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности.

Стандартное отклонение, характеризующее случайную погрешность, вычислено из нескольких серий экспериментально полученных результатов измерений по данной методике, выполненных с целью проведения дисперсионного анализа всех ее стадий: пробоотбор, пробоподготовка, инструментальные измерения ($s_x = 0.003$).

Дисперсионный анализ и обсуждение результатов

Данные для дисперсионного анализа стадий разработанной нами химико-аналитической методики получены из измерений содержания формальдегида в реальном водном объекте. Планирование эксперимента и схема расположения данных по [12]: согласно действующей

щей ведомственной инструкции отдельно анализировали три параллельных пробоотбора воды в трех точках водоема. Результаты анализа представлены в табл.1, где приведены непосредственно измеренные величины аналитических сигналов хроматографа, соответствующие содержанию формальдегида в анализируемой воде в количестве, не превышающем ПДК. Дисперсии аналитических сигналов отличаются от дисперсий массовых концентраций формальдегида на масштабный множитель b^{-2} .

Таблица 1. Экспериментальные данные для изучения составляющих дисперсий, обусловленных стадиями пробоотбора, пробоподготовки и анализа пробы (i – номер пробоотбора; $i = l, k$; j – номер пробоподготовки, $j = l, m$; v – номер измерения аналитического сигнала, $v = l, n$)

Стадия пробоотбора, i	Стадия пробоподготовки, ij	Параллельные определения, x_{ijv}	Суммы по строкам
1	1.1	111.87; 111.53; 110.00	333.40
	1.2	107.77; 107.22; 107.77	322.76
	1.3	112.87; 111.28; 112.59	336.74
2	2.1	123.00; 125.01; 123.01	371.02
	2.2	123.18; 123.33; 122.56	369.07
	2.3	118.95; 122.52; 120.76	362.23
3	3.1	112.35; 113.91; 112.49	338.75
	3.2	113.06; 115.08; 115.27	343.41
	3.3	117.18; 115.39; 115.27	347.84

Исходя из условий эксперимента, полагаем, что все результаты измерений независимы, каждый из km результатов, полученный усреднением n результатов параллельных измерений, рассматриваем как случайные выборки из генеральных совокупностей, подчиняющихся нормальному распределению. Допускаем, что эти генеральные совокупности имеют разные генеральные средние, но одну и ту же генеральную дисперсию. Результаты расчетов представлены в табл.2.

Таблица 2. Дисперсионный анализ для изучения составляющих дисперсии, обусловленных стадиями пробоотбора, пробоподготовки и инструментального измерения.

$$\text{Вспомогательные суммы: } D_1 = \sum_i^k \sum_j^m \sum_v^n x_{ijv}^2 = 362512.17; \quad D_2 = \frac{1}{n} \sum_i^k \sum_j^m x_{ij}^2 = 362492.38;$$

$$D_3 = \frac{1}{mn} \sum_i^k (\sum_j^m x_{ij})^2 = 362428.87; \quad D_4 = \frac{1}{mnk} (\sum_i^k \sum_j^m (x_{ij}))^2 = 361740.74$$

Характер рассеяния	Число степеней свободы	Выборочные дисперсии	Компоненты генеральных дисперсий	Вклад в общую дисперсию, %
1	2	3	4	5
С учетом всех стадий	$f_3 = k - 1 = 2$	$s_3^2 = \frac{D_3 - D_4}{f_3} = 344.07$ $s_3^2 \approx mn\sigma_3^2 + n\sigma_2^2 + \sigma_1^2$	$\sigma_3^2 = \frac{s_3^2 - s_2^2}{mn} = 37.05$	$\frac{100 \cdot \sigma_3^2}{\sigma_{\text{общ}}^2} = 89.7$
Стадии пробоподготовки и измерения	$f_2 = k(m - 1) = 6$	$s_2^2 = \frac{D_2 - D_3}{f_2} = 10.58$ $s_2^2 \approx n\sigma_2^2 + \sigma_1^2$	$\sigma_2^2 = \frac{s_2^2 - s_1^2}{n} = 3.16$	$\frac{100 \cdot \sigma_2^2}{\sigma_{\text{общ}}^2} = 7.6$

Таблица 2. Продолжение.

1	2	3	4	5
Только стадия измерения	$f_1 = km(n-1) = 18$	$s_1^2 = \frac{D_1 - D_2}{f_1} = 1.10$ $s_1^2 \approx \sigma_1^2$	$\sigma_1^2 = s_1^2 = 1.10$	$\frac{100 \cdot \sigma_1^2}{\sigma_{общ}^2} = 2.7$
Рассеяние по всей таблице	$f = kmn - 1 = 27$		$\sigma_{общ}^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 = 41.31$	

Самая малая составляющая этой дисперсии относится к стадии инструментальных измерений. С этим вкладом сравним и вклад стадии пробоподготовки. Из результатов расчетов видно, что стадия пробоотбора вносит максимальный вклад в дисперсию результатов анализа. Это может быть обусловлено как неправильной методикой пробоотбора, так и неоднородностью анализируемого материала, в данном случае воды водоема.

Литература

1. Налимов В.В.. Применение математической статистики при анализе вещества. М.: ФизМатГиз, 1960. 432 с.
2. Зарембо О.К., Лошак А.К., Гуменный В.С. Гигиенические проблемы воздействия формальдегида на население. Обзорная информация. «Медицина и здравоохранение» ВНИИМИ. Серия гигиена. М.:1986. Вып.3. 60 с.
3. Предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воде и водных объектах хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. МЗ СССР. М. 2932-83.
4. Van Hoof F., Wittoxc A., Van Buggenhout E., Janssens J. Anal. chem. acta. 1985. V.169. P.419-424.
5. Ogawa Ikue, Fritz James S. J.Chromatogr. 1985. V.329. No.1. P.81-89.
6. Priha Eero., Ahonen Ilpo. Kemia-Kemi. 1984. V.11. No.6. P.461-464. (фин.)
7. Яворовская С.Ф. Газовая хроматография – метод определения вредных веществ в воздухе и в биологических средах. М.: Медицина, 1972. 288 с.
8. Греков А.П., Отрошко Г.В. Гидразинометрия. Киев: Наукова думка, 1981. 260 с.
9. Калякин С.Н., Поддубных Л.П., Дурнев В.Ф. Тез. докл. Всес. конф. мол. ученых по экстракции. Донецк. 1990. С.14-15.
10. Представление результатов химического анализа (рекомендации IUPAC 1994 г.) Ж. аналит. химии. 1998. Т.53. №9. С.999-1018.
11. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. М.: Наука. 1983, 416 с.
12. Каплан Б.Я., Филимонов Л.Н., Майоров И.А.. Метрология аналитического контроля производства в цветной металлургии. М: Металлургия.1989. 200 с.

Поступила в редакцию 6 октября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). O.G.Masliy, V.A.Naumenko, N.G.Sabo, L.L.Mikhalskaya. A new chromatographic method of determining formaldehyde in surface waters: elaboration and variance analysis.

According to our variance analysis, the sampling stage of the method may considerably influence the final conclusions based on results of an analysis, especially in the case when the measured value is close to the rejection boundary (maximum allowable concentration; MAC). It follows that the way of water sampling from ponds also needs to be regulated by the method. A liquid-chromatographic method has been elaborated for determining formaldehyde in pond waters in the range 0.4 to 10 MAC; the lower limit at the confidence probability 0.95 is 0.020 mg/l. The confidence interval is ± 0.003 mg/l; the relative standard deviation $s_r = 0.001$ (in the middle of the calibration scale).

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 547.772.2 + 541.65'67

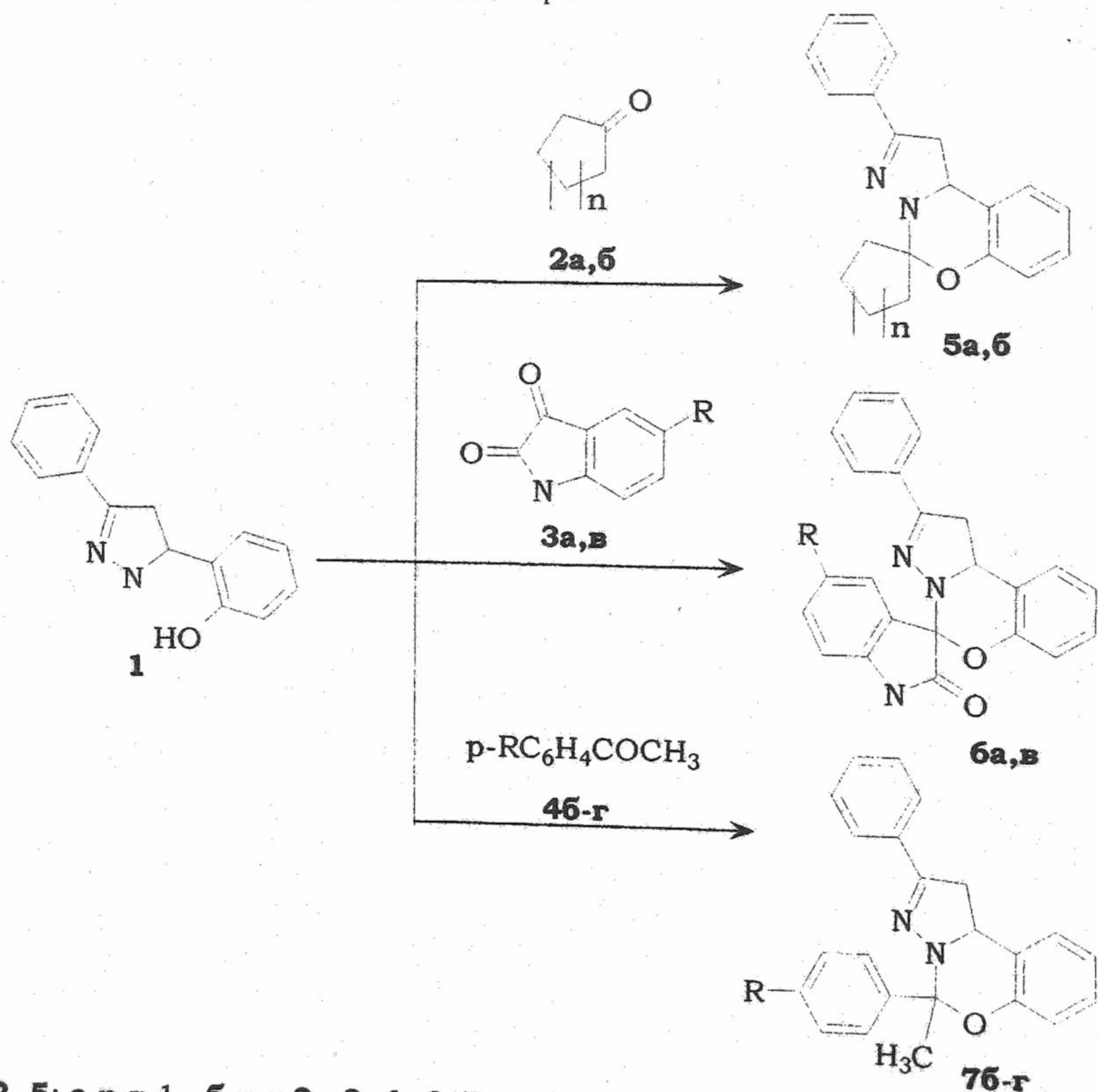
2,2-ДИЗАМЕЩЕННЫЕ 6,6А-ДИГИДРО-1Н-ПИРАЗОЛО-
[1,5-С]-БЕНЗ[Е]-1,3-ОКСАЗИНОВ

© 2000 С.М.Десенко*, В.Н.Черненко, В.Д.Орлов, В.И.Мусатов*

Конденсацией 5-(2-гидроксифенил)-3-фенил-1Н-пиразолина с различными карбонильными соединениями получены замещенные 6,6а-дигидро-1Н-пиразоло [1,5-с]-бенз[е]-1,3-оксазины. На основе данных ПМР, с использованием ядерного эффекта Оверхаузера проанализировано пространственное строение полученных соединений.

Реакция 2-гидроксизамещенных азолов с карбонильными соединениями является удобным методом формирования продуктов с частично гидрированной азолобензоксазиновой системой. В продолжение предыдущих работ [1,2] нами синтезированы некоторые 2,2-дизамещенные 6,6а-дигидро-1Н-пиразоло[1,5-с]бенз[е]-1,3-оксазины, выявлены факторы, влияющие на их образование, рассмотрены особенности их пространственного строения.

Синтез целевых соединений был осуществлен кипячением эквимолярных количеств 5-(2-гидроксифенил)-3-фенилпиразолина **1** и соответствующих карбонильных соединений **2а,б**, **3а,б**, **4а-в** в метаноле и *n*-амиловом спирте.



2, 5: *a* *n* = 1, *б* *n* = 2; **3, 4, 6, 7:** *а* *R* = H, *б* *R* = Cl, *в* *R* = Br, *г* *R* = NO₂

* НТК "Институт Монокристаллов" НАН Украины, Харьков 61001, пр.Ленина, 60

Продолжительность процесса и выходы продуктов 5-7 существенным образом зависели как от условий реакции, так и от природы заместителя в исходном карбонильном соединении. Так, циклоалканоны 2а,б конденсировались пиразолином 1 в метаноле за 15...20 минут, образуя целевые продукты с выходами, близкими к количественным. Попытки ввести во взаимодействие бензаннелированные циклоалканоны, такие, как α -тетралон и α -инданон, не увенчались успехом даже в более жестких условиях (длительное кипячение в *n*-амиловом спирте), что может быть обусловлено как дезактивирующим действием бензольного ядра, так и стерическими факторами. В тоже время, производные изатина 3а,в конденсировались с 2-оксифенилпиразолином 1 с образованием продуктов 6а,в в метаноле за 5...10 минут с количественным выходом.

Ацетофеноны 4б-г, содержащие электроноакцепторные заместители, конденсировались с 5-(2-гидроксифенил)-3-фенилпиразолином 1 только при кипячении в течение 1.5 часа в *n*-амиловом спирте с удалением образующейся воды из сферы реакции. Ацетофенон, пропиофенон, бутирофенон, метиларилкетоны, содержащие в ароматическом ядре электронодонорные заместители (алкил, алкокси), а также бензофенон ввести во взаимодействие в этих условиях не удалось – во всех случаях наблюдалось возвращение исходных веществ с незначительными примесями смолистых, трудноидентифицируемых продуктов.

Таким образом, результаты проведенного исследования и их сопоставление с данными предшествующих работ [1, 2] показывают, что реакция образования производных 2,2-дизамещенных 6,6а-дигидро-1Н-пиразоло[1,5-с]-бенз[е]-1,3-оксазинов весьма чувствительна к природе электрофильной компоненты и, в первую очередь, – к электронному и пространственному окружению карбонильной группы. Это проявляется в закономерном снижении реакционной способности в ряду: α -дикарбонильные соединения > ароматические альдегиды \approx алифатические кетоны > ацетофеноны > гомологи ацетофенона, бензоциклоалканоны, а также при введении электронодонорных заместителей.

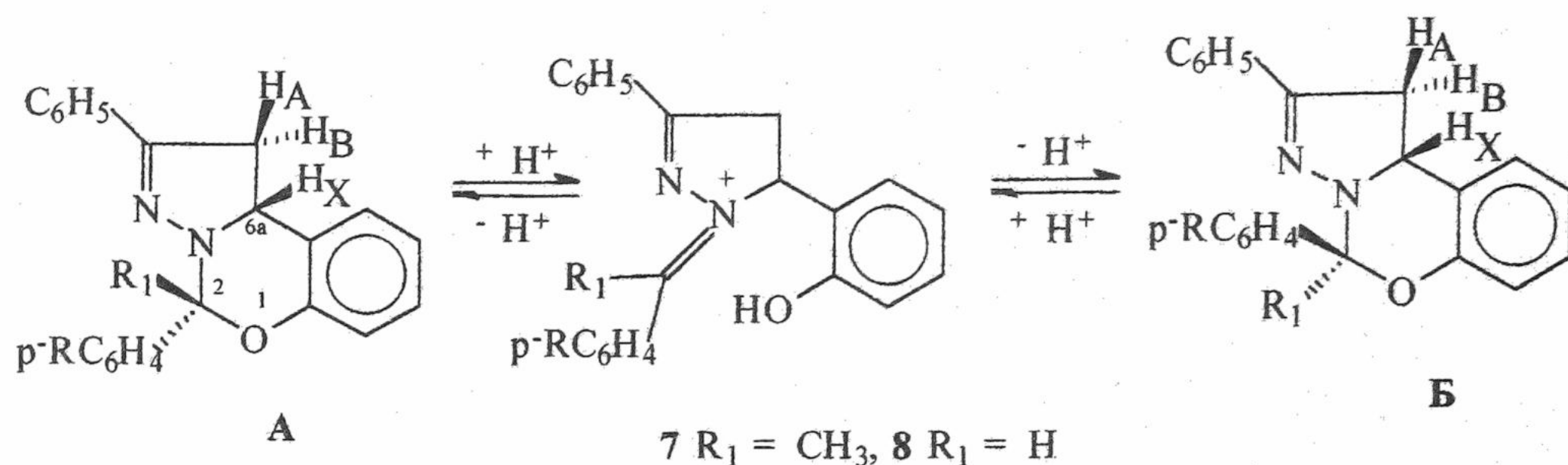
Таблица 1. Характеристики соединений 5а,б, 6а,в, 7б-г

Соединение	Брутто-формула	Найдено N, % Вычислено N, %	T _{пл} , °C	Время реакции, мин	Выход, %
5а	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O	$\frac{9.3}{9.2}$	133-135	20	92
5б	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O	$\frac{9.0}{8.8}$	122-125	20	89
6а	C ₂₃ H ₁₇ N ₃ O ₂	$\frac{11.6}{11.4}$	236-238	7-10	95
6в	C ₂₃ H ₁₆ BrN ₃ O ₂	$\frac{9.5}{9.4}$	251-253	10	98
7б	C ₂₃ H ₁₉ ClN ₂ O	$\frac{7.6}{7.5}$	152-153	90	57
7в	C ₂₃ H ₁₉ BrN ₂ O	$\frac{6.9}{6.7}$	185-187	90	55
7г	C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₃	$\frac{10.9}{10.9}$	175-176	90	73

Однозначно подтверждают структуру соединений 5-7 их спектры ПМР (табл.2), в которых содержатся сигналы ароматических протонов, протонов заместителей и фрагмента СН-СН₂ (АВХ-система) бицикла.

Наличие в молекулах 6, 7 двух хиральных центров предполагает возможность образования в реакции двух различных диастереомеров либо их смесей. Отсутствие в спектрах веществ 6, 7 признаков удвоения однотипных групп сигналов (в том числе и в спектрах неочищенных образцов) указывает на образование в реакции одного из возможных пространственных изомеров. При этом величина одной из геминальных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов фрагмента СН-СН₂ молекул 6, 7 ($J_{ВХ} = 9.4...9.8$ Гц) типична для констант типа J_{aa} , что указывает на близкую к аксиальной ориентацию протона при узловом атоме углерода. В тоже время, КССВ не дают ответа об относительной конфигурации заместителей у атома С(2) бицикла. Изомерное строение

соединений 7 установлено с помощью эффекта Оверхаузера на примере соединения 7г. Дополнительное облучение на частоте резонанса протона 6a-H привело к увеличению интенсивности сигнала CH₃-группы, не отразившись при этом на интенсивности *o*-протонов *l*-нитрофенильного заместителя. Это указывает на цисоидную *aa*-ориентацию протона 6a-H и метильной группы в соединении 7г. Следует отметить, что спектры всех соединений 7б-г характеризуются близкими значениями химических сдвигов δ_{6a-H} . Таким образом, учитывая выявленную ранее [2] высокую чувствительность положения сигнала протона 6a-H к пространственной ориентации арильного заместителя R'C₆H₄, всем соединениям ряда 7б-г следует приписать общую пространственную структуру А.

Таблица 2. Спектры ПМР соединений 5а,б, 6а,в, 7б-г в CDCl₃

Соединение	6-CH ₂		6a-H (H _X) (1H, д.д)	(CH ₂) _n , NH (изатин.), CH ₃ ^{2*}
	H _A ^{1*} (1H, у.д)	H _B (1H, д.д)		
5а	3.39	3.62	4.93	1.4...2.3(8H, м, (CH ₂) ₄)
5б	3.43	3.64	4.89	1.1...2.5(10H, м, (CH ₂) ₅)
6а	3.52	3.77	5.43	10.97 (1H, с, NH)
6в	3.61	3.79	5.46	11.13 (1H, с, NH)
7б	3.14	3.45	4.75	2.06 (3H, с, CH ₃)
7в	3.15	3.47	4.71	2.05 (3H, с, CH ₃)
7г	3.15 3.21	3.51 3.61	4.62 5.31	2.05 (3H, с, CH ₃) 1.84 (3H, с, CH ₃) ^{3*}

^{1*}КССВ: J_{AB} = 15.3...16.1, J_{AX} = 0.8...1.15, J_{BX} = 9.4...9.8 Гц.

^{2*}Ароматические протоны соединений 5а,б, 6а,б, 7а-в резонируют в области 6.7...8.3 м.д.

^{3*}Диастереомер Б.

Ранее [2] установлено, что 2-монозамещенные 6,6a-дигидро-1H-пиразоло[1,5-с]-бенз[е]-1,3-оксазинов 8 под действием следовых количеств кислоты легко образуют равновесные смеси диастереомерных форм А и Б [для 8а,г (R = H, NO₂) C_A:C_B = 40:60]. Процесс полной аномеризации соединений 8 требовал менее 5 минут в растворах CDCl₃, содержащих ~0.1% DCl, [2]. Соединение 7г в этих условиях оказалось более стабильным – появление заметных в спектрах ПМР (~5%) количеств аномера Б потребовало 1-2 часа; равновесная же концентрация (10-15% по интегральным интенсивностям соответствующих сигналов; без дальнейших изменений) достигалась через двое суток. Отметим, что переход соединения 7г в форму Б сопровождается заметным сдвигом в сильные поля сигнала протона H_X и слабопольным сдвигом сигнала метильной группы. Аналогичное различие в положении сигналов наблюдалось ранее [2] для протонов H_X и 2-H аномеров А и Б соединений 8 и связывалось с изменением их ориентации по отношению к фениленовому ядру (для протона H_X) либо 2-арильному заместителю (для протона 2-H). Так как рентгеноструктурным анализом [2], отмеченные различия в положении сигналов форм А и Б следует считать дополнительным подтверждением их пространственного строения и в случае соединения 7г.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР сняты в CDCl_3 на спектрометре Varian Mercury VX-200, внутренний стандарт – ТМС. Индивидуальность соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254, элюент – хлороформ.

2,2-Тетраметилен-5-фенил-6,6a-дигидро-1H-пиразоло[1,5-c]-бенз[e]-1,3-оксазин (5a). Смесь 2.4 г (0.01 моль) 5-(2-гидроксифенил)-3-фенил-1H-пиразолина 1 и 0.85 г (0.01 моль) циклопентанона 2a в 50 мл метанола нагревают 20 минут, охлаждают и отфильтровывают 2.7 г (92%) соединения 5a с $T_{\text{пл}}$ 133-135 °C (из метанола).

Аналогично из соответствующих карбонильных соединений получают соединения 5б, 6a, в.

2-Метил-2-(4-нитрофенил)-5-фенил-6,6a-дигидро-1H-пиразоло[1,5-c]-бенз[e]-1,3-оксазин (7г). Смесь 2.4 г (0.01 моль) соединения 1 и 1.55 г (0.01 моль) п-нитроацетофенона 4г в 20 мл н-амилового спирта кипятят 1.5 часа с азеотропной отгонкой воды. Раствор охлаждают, смешивают с 50 мл метанола, охлаждают и отфильтровывают 2.75 г (73%) соединения 7г с $T_{\text{пл}}$ 236-238 °C (из смеси метанол-ДМФА, 5:1).

Аналогично получают соединения 7б, в.

Литература

1. Орлов В.Д., Гетманский Н.В., Оксенич И.А., Иксанова С.В. Химия гетероцикл. соед. 1991. №8. С.1131-1135 .
2. Десенко С.М., Гетманский Н.В., Черненко В.Н., Землин И.М., Шишкин О.В., Орлов В.Д. Химия гетероцикл. соед. 1999. №6. С.805-814.

Поступила в редакцию 11 сентября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). S.M.Desenko, V.N.Chernenko, V.D.Orlov, V.I.Musatov. 2,2-Disubstituted 6,6a-dihydro-1H-pyrazolo- [1,5-c]-benzo[e]-1,3-oxsazines.

2,2-Disubstituted derivatives of 6,6a-dihydro-1H-pyrazolo- [1,5-c]-benzo[e]-1,3-oxsazines have been synthesized by the condensation of 5-(2-hydroxyphenyl)-3-phenylpyrazolyne with different carbonyl compounds. The spatial structure of compounds obtained has been analyzed proceeding from 1H-NMR spectra including nuclear Overhauser effect.

УДК 547.856.+547-327

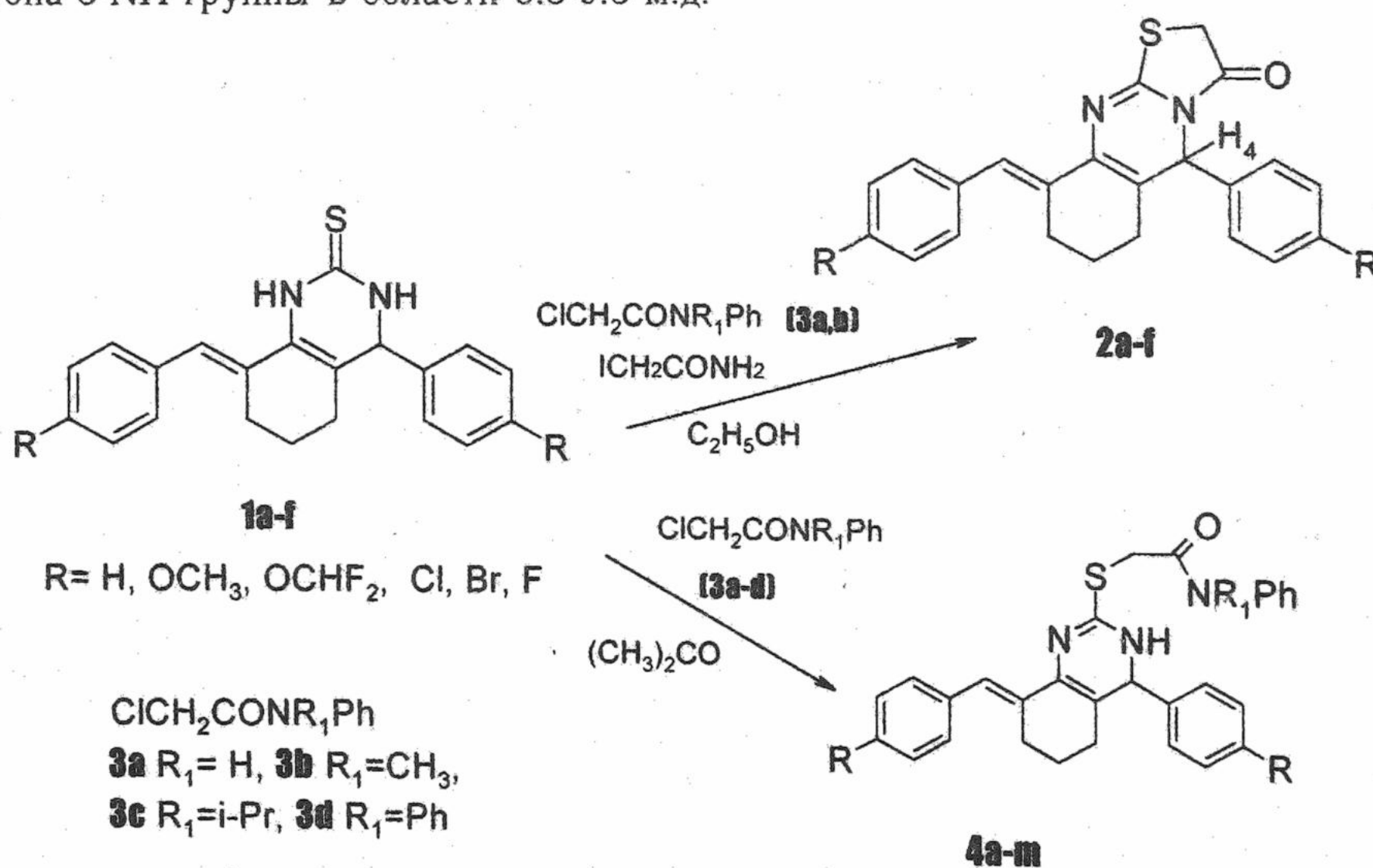
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЧАСТИЧНО ГИДРИРОВАННЫХ ХИНАЗОЛИНТИОНОВ С АМИДАМИ α -ГАЛОГЕНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

© 2000 О.Д.Кололейкина, И.М.Гелла, В.Д.Орлов

При взаимодействии октагидро-2-хиназолинтioneв с алифатическими и ароматическими амидами монохлоруксусной кислоты могут образовываться как *S*-метилкарбамоильные соединения, так и гексагидротиазоло-[2,3b]-хиназолиноны. Строение полученных соединений доказано спектральными методами.

4-Арил-8-арилиден-1,2,3,4,5,6,7,8-октагидро-2-хиназолинтioneы 1, как и другие циклические производные тиомочевины, гладко алкилируются алкилгалогенидами до соответствующих 2-алкилтиогексагидрохиназолинов [1], а с монохлоруксусной кислотой 1 дают гексагидро-5Н-тиазоло-[2,3b]-хиназолин-3-оны 2 [2]. Целью настоящей работы является изучение взаимодействия гексагидро-2(1Н)-хиназолинтioneв с амидами монохлоруксусной кислоты.

При взаимодействии октагидро-2-хиназолинтioneа 1а с $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ в этаноле мы получили тиазоло-[2,3b]-хиназолин-3-он 2а идентичный описанному в [2]. Аналогично были получены тиазолы 2b-e. Строение продуктов 2a-e подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии (табл.1,3), которые согласуются с литературными данными [2]. В ИК-спектрах наблюдается характеристическая полоса валентных колебаний циклической $\text{C}=\text{O}$ группы в интервале $1725\text{-}1730\text{ см}^{-1}$, в спектрах ПМР появляются сигналы 4-Н протона с ~ 5.53 м.д., АВ квартета протонов метиленовой группы при 4.05 м.д. и исчезает сигнал протона 3-NH группы в области 8.5-9.3 м.д.



Для отнесения сигналов протонов циклогексановой части молекулы были использованы также расчеты молекулы тиазолон 2а методами молекулярной механики (ММ+) и АМ1. Они показывают, что пиримидиновый цикл 2а практически плоский, а форма циклогексанового цикла близка к симметричному конверту. Расчеты также показывают наличие двух близких по энергии конформеров, различающихся положением атома C_6 относительно плоскости молекулы (рис.1). Поскольку барьер инверсии цикла в таких системах незначителен, они неразличимы в спектрах ПМР. В обоих возможных конформациях протоны при C_6 расположены симметрично относительно ближайших $\text{C}-\text{C}$ связей. В силу этого их химические сдвиги должны быть практически одинаковы. Фенильная группа бензилиденного фрагмента выведена из плоскости двойной связи на угол величиной $\sim 10^\circ$ из-за отталкивания с атомами водорода у C_7 . Фенильная группа у C_4 повернута относительно

связи C_4-C_{4a} на $60-64^\circ$. Такая ориентация фенила при атоме C_4 обуславливает большое различие в химических сдвигах протонов у C_5 атома по сравнению с аналогичной парой протонов у C_7 атома (табл.3).

При кипячении 1 с N-хлорацетиланилином и N-метил-N-хлорацетиланилином (3a,b соответственно) в этаноле образуются также тиазоло-[2,3b]-хиназолины. В случае N-изопропил-N-хлорацетиланилина и N-хлорацетилдифениламина (3c,d соответственно) в тех же условиях процесс останавливается на первой стадии с образованием соответствующих S-метилкарба-моильных производных 4. Строение продуктов 4 подтверждено спектральными характеристиками (табл.2,3). В ИК-спектрах присутствует полоса валентных колебаний ациклической амидной $C=O$ группы при 1660 см^{-1} . В спектрах ПМР сигналы протона 3-NH группы наблюдаются в области 11.5 м.д., протонов метиленовой группы – при 4.1 м.д. Следует отметить, что протоны метиленовой группы соединений 4, как и в случае хиназолин-[2,3b]-тиазолонов, магнитнонеэквивалентны, но различие в химических сдвигах между ними меньше, так как возможно свободное вращение вокруг $C-S$ связи.

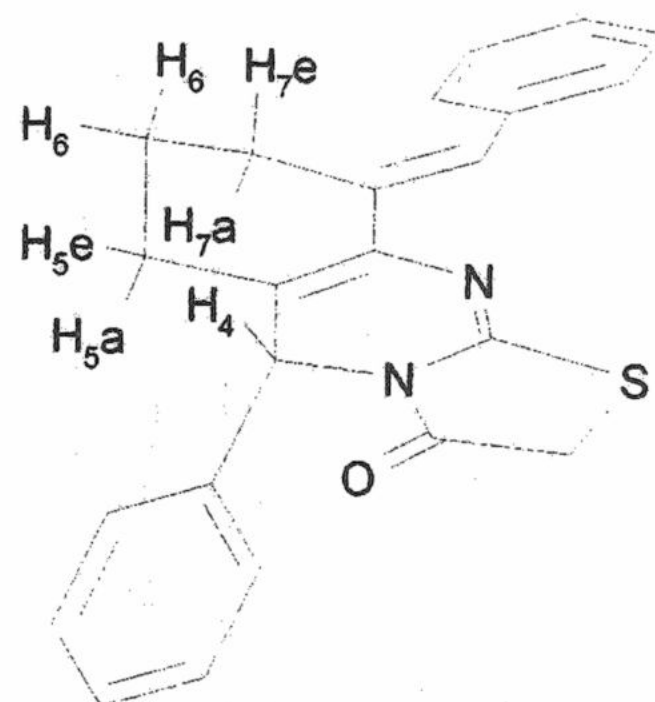
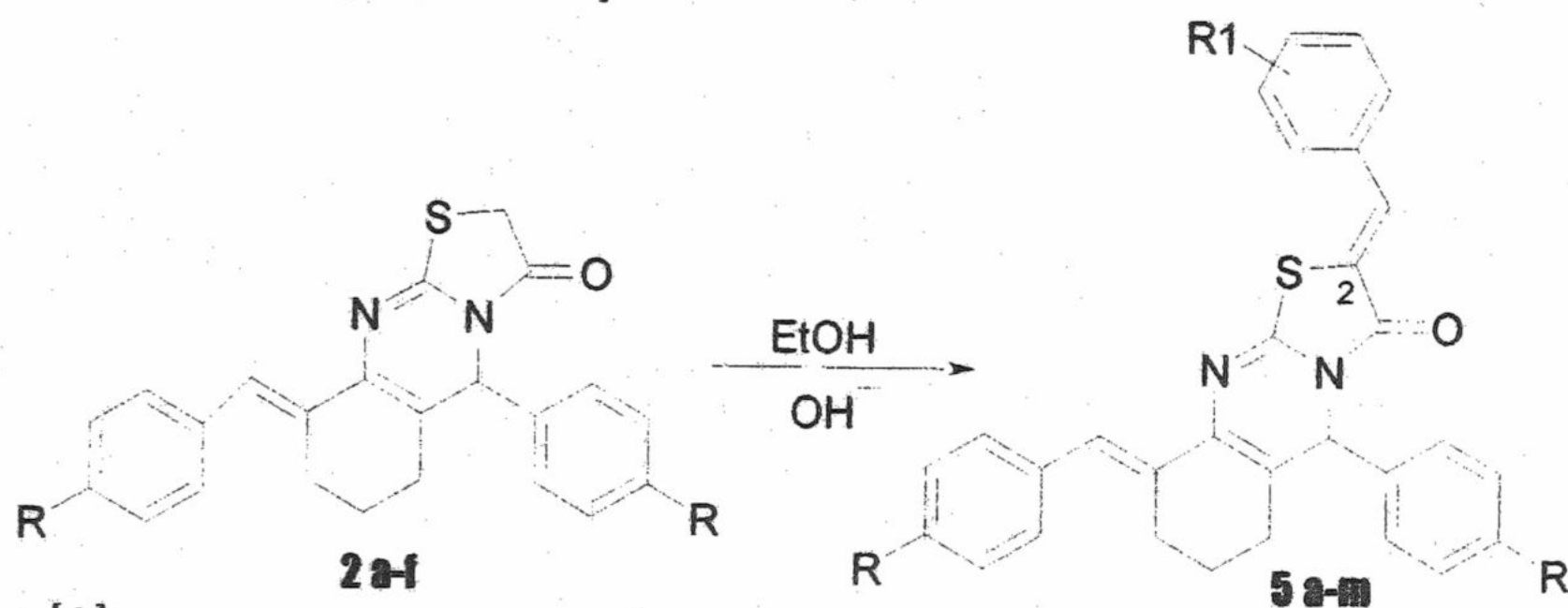


Рис.1

В апротонных условиях при взаимодействии 2-хиназолинтионов 1a-f с N-хлорацетиланилинами 3a-d в ацетоне образуются исключительно S-метилкарбамоильные производные 4 в виде стабильных хлоргидратов, которые далее можно перевести в основания поташом в водном спирте.

На основании представленных данных можно сделать вывод, что взаимодействие хинолинтионов 1a-f с амидами монохлоруксусной кислоты может идти как с образованием продуктов S-алкилирования, так и с дальнейшим их превращением в тиазолохинолины в зависимости от строения амидов 3a-d и от условий проведения реакции. Основность амина не играет существенной роли, так как даже в случае N-хлорацетилпиперидина в этаноле образуется только продукт гетероциклизации.



Известно [2], что при кипячении 2a с ароматическими альдегидами в ледяной уксусной кислоте в присутствии NaAc получают 2-арилиден-5-фенил-9-бензилиден-2,3,6,7,8,9-гексагидро-5H-тиазоло-[2,3b]-хинолин-3-оны. Мы нашли, что конденсации тиазолонов 2a-f с альдегидами гладко протекают при комнатной температуре в этаноле в присутствии щелочи с образованием 2-арилидентиазолонов 5a-m. Взаимодействие проходит по C_2 метиленовой группе, о чем свидетельствует исчезновение сигнала CH_2 группы в спектрах ПМР и смещение частоты валентных колебаний циклической $C=O$ группы в ИК-спектрах в результате сопряжения с арилиденной группой. Как и при конденсации ароматических альдегидов с цикланонами, образуется единственный Z-изомер, о чем свидетельствует химический сдвиг олефинового протона арилиденной группы, находящийся в области сигналов ароматических протонов ($\delta = 7.5-8$ м.д.) [2]. В случае арилиденных производных тиазоло-[3,2-a]-пиримидинов такая ориентация арилиденной группы подтверждена рентгеноструктурным анализом [4].

Таблица 1. Физико-химические характеристики соединений 1, 2

Соединение	R	T _{пл} , °C	ИК, см ⁻¹ , (KBr)		Выход, %
			ν _{C=X}	ν _{N-H}	
1a	H	198-200*	1190(X=S)	3185	76
1b	OCH ₃	184	1188		70
1c	OCHF ₂	160-162	1130	3100	71
1d	Cl	250-252	1149		83
1e	Br	222-223	1189		91
1f	F	181-182	1196	3153, 3403	74
2a	H	202-205*	1725 (X=O)		78
2b	OCH ₃	173-176	1722		80
2c	OCHF ₂	150-152	1732		68
2d	Cl	205-206	1730		85
2e	Br	190-192	1725		93
2f	F	206-207	1730		65

* – литературные данные: T_{пл}(1a)=196-198 °C [3], T_{пл}(2a)=195 °C [2]

Таблица 2. Физико-химические характеристики соединений 4, 5

Соединение	R	R ₁	T _{пл} , °C	ИК, см ⁻¹ , (KBr)		Выход, %
				ν _{C=X}	ν _{N-H}	
4a	H	i-Pr	178-180	1650	3336	58
4b	OCH ₃	i-Pr	170-172	1645	3349	53
4c	Br	i-Pr	185-187	1642	3329	62
4d	Cl	i-Pr	173-175	1645	3336	65
4e	OCHF ₂	i-Pr	83-85	1648	3316	58
4f	H	CH ₃	169-170	1648	3326	59
4g	OCH ₃	CH ₃	172-174	1660	3333	61
4h	Br	CH ₃	209-211	1728	3436	63
4k	Cl	Ph	221-222	1670	3339	62
4l	H	Ph	210-212	1668	3416	63
4m	H	H	207-208	1718	3383	71
5a	OCH ₃	p-Br	184-186	1705	–	54
5b	OCHF ₂	o-OCHF ₂	190-192	1709	–	55
5c	OCHF ₂	o-F	186-188	1705	–	70
5d	Cl	p-Br	209-212	1700	–	68
5e	Cl	o-F	204-206	1715	–	65
5f	Cl	H	228-230	1702	–	55
5g	Cl	m-Br	190-192	1703	–	53
5h	Cl	p-CH ₃	220-223	1705	–	60
5k	Cl	o-OCHF ₂	213-215	1712	–	58
5l	F	p-Cl	196-198	1710	–	63
5m	F	o-NO ₂	192-193	1714	–	61

Таблица 3. ЯМР-спектральные характеристики некоторых продуктов

Соединение	H ₆	H ₅		H ₇ *		H ₄	H _b	NH	Сигналы других протонов
		a	e	a	e				
1a	1.57	1.86		2.41	2.61	4.84	7.61	6.5	
1b	1.62	1.95		2.35	2.65	4.7		8.55 8.8	
1d	1.59	1.89		2.1	2.6	4.86	7.05	9.12 9.32	
2a	1.52	1.82	2.11	2.5	2.62	5.5			4.058(CH ₂)
2c	1.54	1.81	2.11	2.0	2.5	5.54			4.01 (-)
2d	1.53	1.83	2.16	2.5	2.62	5.58			4.06 (-)
2e	1.52	1.79	2.10	2.5	2.6	5.52	7.22		4.05 (-)
2f	1.53	1.78	2.12	2.5	2.6	5.54			4.02 (-)
4m	1.51	1.9	2.0	2.5	2.6	4.95		8.3	10.6(NH)
4l	1.6	1.9	2.2	2.5	2.7	5.48	7.1	11.2	
4a	1.64	1.9	2.1	2.5	2.65	5.48	6.98	11.5	4.7(N-isoPr) 4.1(CH ₂)
4n	1.58	1.84	1.97	2.5	2.6	3.7	4.92	8.21	7.14 (NH ₂)
5a	1.6	1.83	2.16	2.5	2.62	5.63			
5b	1.59	1.85	2.2	2.2	2.7	5.8			
5c	1.6	1.82	2.11			5.79			
5d	1.57	1.81	2.22	2.5	2.63	5.8			
5e	1.58	1.82	2.1	2.5	2.63	5.78			
5f	1.6	1.82	2.2	2.5	2.63	5.78			
5g	1.59	1.82	2.21	2.5	2.63	5.8			
5h	1.58	1.82	2.21	2.5	2.63	5.78			
5k	1.6	1.84	2.21	2.5	2.65	5.8			
5l	1.58	1.82	2.21	2.5	2.63	5.78			
5m	1.58	1.82	2.1	2.5	2.63	5.78			

* — сигналы ~ 2.5 м.д. перекрываются сигналами протонов DMCO-D₆

Экспериментальная часть

ПМР спектры получены на приборе VXR-300 'VARIAN' в ДМСО. ИК спектры сняты в таблетках KBr на приборе Specord IR-75. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 в системе толуол-этанол (9:1).

4-фенил-8-бензилиден-1,2,3,4,5,6,7,8-октагидро-2-хиназолинтион 1a.

К смеси 5.5 г (0.02 моль) дибензилиденциклогексанона и 3 г (0.04 моль) тиомочевин в 150 мл этилового спирта добавляют 5 мл 40% раствора NaOH и кипятят с обратным холодильником до исчезновения в реакционной смеси исходного кетона (4-6 часов, контроль по ТСХ). После охлаждения выпавший продукт отфильтровывают, промывают небольшим количеством чистого растворителя и перекристаллизовывают из смеси этанол-толуол. Выход: 5 г (76%).

Остальные хинолидинтионы 1b-f получены аналогично.

5-фенил-9-бензилиден-2,3,6,7,8,9-гексагидро-5H-тиазоло-[2,3-b]-хиназолин-3-он 2a.

Смесь 0.83 г (2.5 ммоль) хинолидинтиона 1a и 0.46 г (2.5 ммоль) йодацетамида в 20 мл этилового спирта кипятят с обратным холодильником до исчезновения в реакционной смеси исходного хинолидинтиона (контроль по ТСХ). После охлаждения отфильтровывают выпавший продукт, промывают тщательно чистым растворителем, сушат на воздухе и перекристаллизовывают из смеси растворителей этанол-толуол. Выход: 0.73 г (78%).

Остальные тиазоло-[2,3b]-хиназолиноны 2b-f получены аналогично.

N1-фенил-2-(4-фенил-8-бензилиден-3,4,5,6,7,8-гексагидро-2-хиназолинилсульфанил)-ацетамид 4m.

Смесь 1 г (3 ммоль) хинолидинтиона 1a, 0.5 г (3 ммоль) N-хлорацетиланилина 3a в 15 мл спирта кипятят с обратным холодильником в течении 2.5-3 часов. После охлаждения осадок отфильтровывают, промывают небольшим количеством чистого растворителя. Полученную соль заливают 15 мл спирта и к теплему раствору при постоянном перемешивании

вании добавляют 15 мл насыщенного водного раствора Na_2CO_3 . Продолжительность перемешивания 2 часа. Полученный продукт отфильтровывают, промывают небольшим количеством воды и перекристаллизовывают из этанола. Выход: 0.92 г (71%).

Аналогично были получены продукты 4а-е, к, л.

N1-метил-N1-фенил-2-(4-фенил-8-бензилиден-3,4,5,6,7,8-гексагидро-2-хиназолинил-сульфанил)-ацетамид 4f.

Смесь 1 г (3 ммоль) хиназолинтиона 1а, 0.55 г (3 ммоль) N-метилхлорацетиланилина в 15 мл ацетона кипятят с обратным холодильником в течении 1.5-2,5 часов. После охлаждения образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают небольшим количеством чистого растворителя. К суспензии полученной соли в спирте при постоянном перемешивании добавляют 10 мл насыщенного водного раствора Na_2CO_3 и продолжают перемешивать в течении 2-2.5 часов. Полученный продукт отфильтровывают, промывают небольшим количеством воды и перекристаллизовывают из этанола. Выход: 0.84 г (59%).

Аналогично были получены продукты 4g, h, п.

5-(4-хлорофенил)-9-(4-хлоробензилиден)-2-бензилиден-2,3,6,7,8,9-гексагидро-5H-[1,3]-тиазоло-[2,3b]-хиназолин-3-он 5f.

К суспензии 1.1 г (2.5 ммоль) хиназолинтиазолона 2d, 0.53 г (5 ммоль) бензальдегида в 15 мл этанола добавляют 4-6 капель концентрированного раствора NaOH и выдерживают в течении 6 часов при постоянном перемешивании. Образовавшийся осадок отфильтровывают, тщательно промывают чистым растворителем и высушивают на воздухе. При необходимости продукт может быть перекристаллизован из ледяной уксусной кислоты. Выход: 0.71 г (55%).

Аналогично были получены продукты 5а-т.

Литература

1. Lorand T., Szabo D., Foldesi A. Acta Chem. Hung. 1980. V.104(2). P.147-160.
2. Lorand T., Szabo D., Foldesi A., Neszmelyi A. Acta Chem. Hung.1981. V.108(2). P.197-214.
3. Lorand T., Szabo D., Neszmelyi A. Acta Chem. Hung. 1977. V.93(1). P.51-65.
4. Tozkoaran B., Ertan M., Kelicen P., Demirdamar R. IL Farmaco 1999. V.54. P.588-593.

Поступила в редакцию 15 сентября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). O.D.Kololeykina, I.M.Gella, V.D.Orlov. Interaction of partially hydrogenized quinazolinthiones with amides of α -halogenacetic acid.

It is shown that both S-methylcarbamoylic compounds and hexahydrothiazolo-[2,3b]-quinazolinones may result from the interaction of hexahydro-2(1H)-quinazolinthiones with alifatic and aromatic amides of monochloroacetic acid. Structure of the compounds obtained is confirmed by spectral methods.

УДК 547.7/8

2-КАРБОКСИ- ТА 2-КАРБМЕТОКСИПОХІДНІ ДИГІДРО-1,2,4-ТРИАЗОЛО[1,5-А]ПІРИМІДИНУ

© 2000 В.В.Ліпсон*, М.Г.Широбокова*, Т.М.Карножицька*, В.В.Бородіна*

Циклоконденсацією α,β -ненасичених кетонів з 3-аміно-1,2,4-триазол-5-ілкарбоною кислотою та її метиловим ефіром одержано ряд нових похідних дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідину, які призначено для вивчення антидіабетичних властивостей. Будову сполук доведено спектральними методами.

Біциклічні азолопіримідинові системи з вузловим атомом азоту привертають увагу дослідників, в першу чергу, завдяки широкому спектру фармакологічної активності. Серед похідних з гетероароматичною структурою виявлено інгібітори цАМФ- та цГМФ-фосфодіестераз [1,2], антигіпертензивні та кардіоваскулярні засоби (рокорнал, бумепідил) [3], антагоністи рецепторів ангіотензину [4], речовини з протизапальною та гіпоглікемічною дією [3,5]. Слід відзначити також, що вони ізомерні природним сполукам – пуриновим основам (аденіну, гуаніну), які виконують важливі функції у регулюванні вуглеводного та ліпідного обміну.

Значно більше різноманіття біологічної дії, виходячи з особливостей будови, потенційно притаманно новим дигідропохідним азолопіримідинів. Проводячи структурні аналогії, слід відзначити, що частково гідровані піримідинові системи близькі за будовою до 1,4-дигідропіридинів, які відіграють надзвичайну роль в енергетичному обміні (НАД.Н \rightarrow НАД⁺). Інтерес до дигідрозазолопіримідинів виник лише в останнє десятиріччя, що пов'язано, в першу чергу, з важкодоступністю названих речовин, більшість з яких розглядалися раніше як можливі інтермедіати у синтезі їх гетероароматичних аналогів. Тому, мабуть, відомості щодо фармакологічної дії цих сполук поки що обмежені. У названому ряду знайдено кардіотоніки, коронарні вазодилататори, запропоновано антигіпертензивні засоби [6,7]. Протимікробну та противірусну активність виявлено у дигідро-6-нітроазоло[1,5-а]піримідинів [8]. Значний анальгетичний ефект спостерігається у 5-(4-метилфеніл)-7-феніл-4,7-дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідин-2-ілсукцинамінової кислоти [9]. Є дані про протизапальну, гіпоглікемічну та антиоксидантну дію цих сполук [5,10-12].

Вперше анельовані азольним циклом дигідропіримідинові системи були одержані японськими дослідниками конденсацією аміноазолів з ариліденпохідними β -дикетонів і ацетоацетатного ефіру [6]. Одночасно, і незалежно від названих дослідників, колективом авторів під керівництвом проф. В.Д.Орлова [13-15] розроблено доступний високоселективний метод синтезу арилпохідних дигідрозазоло[1,5-а]піримідинів на основі реакції α,β -ненасичених карбонільних сполук або їх синтетичних попередників з відповідними α -аміноазолами. Ця реакція значно розширює межі методу, захищеного патентом [6], і дозволяє застосувати її для створення великого масиву похідних азолопіримідинів, подібного до комбінаторних бібліотек, що призначаються для біологічних випробувань.

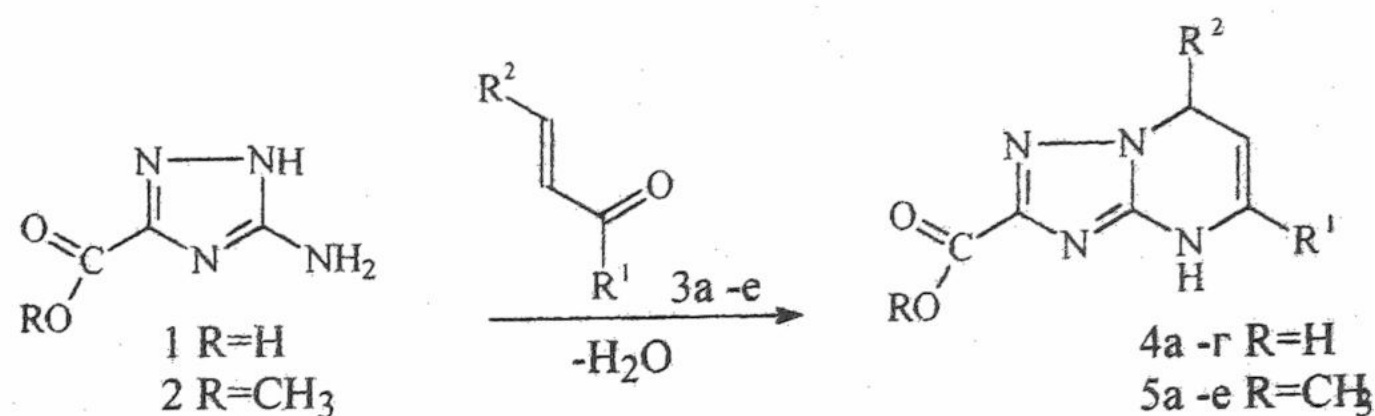
З метою вивчення фармакологічних властивостей ми одержали ряд нових похідних дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідину, що містять у положенні 2 біциклу карбокси- та карбметоксигрупи. Вибір замісників обумовлений необхідністю підвищити розчинність або ліпофільність сполук цього ряду.

Дигідропохідні 4а-г, 5а-е одержано конденсацією амінів 1, 2 з α,β -ненасиченими кетонами 3а-е у *n*-бутанолі (ВнОН) або диметилформаміді (ДМФА).

Встановлено, що при кип'ятінні еквімолярної кількості 3-амінотриазоліл-5-карбоною кислоти 1 і бензальацетофенону 3а як у спиртовому середовищі, так і в ДМФА поряд з циклізацією відбувається декарбоксілювання, в наслідок чого утворюється 4,7-дигідро-5,7-дифеніл-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідин вже описаний раніше [13]. Виявилось, що одержані

* Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України, м.Харків

ти цільові кислоти 4 можна у більш м'яких умовах при нагріванні реакційної суміші не вище 100 °С. Запобігти декарбоксілуванню дозволяє і перетворення карбоксигрупи у сполуці 1 на складноефірну. Взаємодією аміну 2 з ненасиченими кетонами 3а-г синтезовано ряд карбметокси похідних 5а-е. Будову сполук 4а-г, 5а-е доведено спектральними методами (табл.1, табл.2).



3, 4, 5: а, б R¹=4-CH₃, в, г, д R¹=C₆H₅, е R¹=4-CH₃-C₆H₄;
а, в R²=C₆H₅, б, г R²=4-OCH₃-C₆H₄, д R²=2-CF₃-C₆H₄, е R²=4-Cl-C₆H₄

Таблиця 1. Фізико-хімічні характеристики сполук 4а-г та 5а-е

Сполука	T _{пл} , °С	ІЧ спектр (КВг), ν, см ⁻¹	УФ спектр (абс. етанол) λ _{max} , нм	Вихід, %
4а	195 ¹⁾	3400-2800, 1684, 1664	267	65
4б	200	3412-2724, 1672, 1658	278	61
4в	236	3350-2800, 1664, 1654	300	78
4г	220	3350-2900, 1692, 1656	292	75
5а	206-207	3232, 1748, 1688	252	69
5б	221-222	3232, 1748, 1684	265	71
5в	216-217	3312, 1736, 1660	285	75
5г	228-230	3308, 1736, 1664	283	72
5д	224-226	3208, 1748, 1664	294	84
5е	239-241	3324, 1736, 1664	285	85

¹⁾Сполуки 4а-г плавляться з розкладом.

Таблиця 2. Дані спектрів ПМР сполук 4в та 5в, зареєстровані в ДМСО-D₆, δ м.д., (КССВ, J, Гц)

Сполука	Аг-Н (10Н, м)	6-Н (1Н, д)	7-Н (1Н, д)	NH (1Н, с)	Сигнали протонів замісників
4в	7.3-7.7	5.20 (3.6)	6.21 (3.6)	10.0	COOH 12.0, 1Н, р.с. ²⁾
5в	7.3-7.6	5.25 (3.6)	6.29 (3.6)	10.2	COOCH ₃ , 3.78, 3Н, с.

²⁾ р.с. – розширений синглет.

Присутність в ІЧ спектрах сполук 4а-г широкої смуги поглинання у діапазоні 3400 – 2800 см⁻¹ та інтенсивної смуги в інтервалі 1664-1692 см⁻¹ підтверджує наявність в їх структурі карбоксильної групи.

Відомо, що похідні дигідрозолопіримідинів можуть існувати в імінній (6,7-дигідро-) та енамінній (4,7-дигідро-) таутомерних формах [15]. Досить високочастотне (1654-1688 см⁻¹) розташування смуги поглинання зв'язку С=С в ІЧ спектрах сполук 4а-г та 5а-е, згідно з опублікованими даними [13], вказує на 4,7-дигідроструктуру синтезованих речовин у твердій фазі. Електронні спектри поглинання розчинів розглянутих сполук є аналогічними спектрам інших 4,7-дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідинів [13,15] і характеризуються наявністю малоінтенсивної полоси поглинання в області 252-300 нм. Відсутність

більш довгохвильового поглинання, відповідно даним монографії Десенка і Орлова [15], вказує на відсутність в цих розчинах імінної 6,7-дигідроформи.

Однозначну інформацію щодо таутомерного складу сполук 4в та 5в у розчинах ДМСО- D_6 несуть їх спектри ПМР (табл.2). Імінні таутомери мають у положенні 6 біциклу на один атом водню більше, ніж енамінні, у зв'язку з цим їх спектри повинні суттєво відрізнятися в області резонансу аліфатичних протонів. Спектри сполук 4в, 5в характеризують індивідуальні 4,7-дигідроформи цих речовин. Таким чином, 2-карбокси- та 2-карбметоксипохідні як у розчинах, так і в кристалах знаходяться у енамінній 4,7-дигідроформі, що є типовим для дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідинів [15].

Наявність відомостей щодо гіпоглікемічної дії близьких структурних аналогів одержаних нами речовин [5], а також дані про їх антиоксидантні властивості [12] є підставою для подальшого вивчення антидіабетичної активності нових похідних дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідину.

Експериментальна частина

ІЧ спектри сполук 4а-г, 5а-е зареєстровано в таблетках КВг на спектрометрі Specord M-82, УФ спектри – на спектрофотометрі Specord UVVis. Спектри ПМР записано на приладі Bruker AM-300, внутрішній еталон – ТМС. Хід реакції та чистоту речовин, що утворюються, контролювали за допомогою ТШХ на платівках Silufol UV-254 у системах бензол-метанол (9:1), бензол-хлороформ (1:1).

(5-Метил-7-феніл-4,7-дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідин-2-іл)карбонова кислота (4а). Суміш 0.13 г (1 ммоль) 3-аміно-1,2,4-триазоліл-5-карбонової кислоти 1 і 0.15 г (1 ммоль) бензальацетону 3а в 1 мл ДМФА (або н-ВуОН) нагрівають на киплячій водяній бані до повного розчинення вихідної кислоти, витримують при температурі 95-100 °С ще 30 хв. Реакційну суміш охолоджують, додають 15 мл бензолу, осадок, що утворився фільтрують. Вихід продукту 4а - 0.17 г (65 %), $T_{пл}$ 195 °С (з розкладом).

Аналогічно одержують сполуки 4б-г.

2-Карбметокси-5-метил-7-феніл-4,7-дигідро-1,2,4-триазоло[1,5-а]піримідин (5а). Суміш 0.14 г (1 ммоль) метилового ефіру 3-аміно-1,2,4-триазоліл-5-карбонової кислоти 2 і 0.15 г (1 ммоль) бензальацетону 3а в 1 мл ДМФА кип'ятять 2,5 години. Додають 15 мл бензолу. Промивають водою для вилучення ДМФА. Органічний екстракт висушують над безводним Na_2SO_4 . Надлишок розчинника випарюють при зниженому тиску повітря. Залишок кристалізують з ацетону. Вихід 0.19 г (69 %), $T_{пл}$ 206-207 °С.

Аналогічно одержують сполуки 5б-е.

Література

1. Davis A., Warrington B.H., Vinter J.G. J. Comput. Aided Mol. Des. 1987. V.1. №2. P.97-119.
2. Заявка 728,759 EP. Chem. Abstr. 1996. V.125. 221861k.
3. Fischer G. Advanc. Heterocyclic Chem. 1993. V.57. P.81-138.
4. Заявка 2690442 FR. Изобрет. стран. мира. 1994. Вып.41, №22-24. С.54.
5. Десенко С.М., Липсон В.В., Горбенко Н.И. Пивоваревич Л.П., Рындина Е.Н., Мороз В.В., Варавин В.П. Хим.-фарм. журнал. 1995. №4. С.37-39.
6. Пат. 61,227,584 JP. Chem. Abstr. 1986. V.106. 176416m.
7. Пат. 328700 EP. Chem. Abstr. 1990. V.113. 29258c.
8. Пиличева Т.Л., Русинов В.Л., Егорова Л.Г., Чупахин О.Н., Владыко Г.В., Коробченко Л.В., Бореко Е.И. Хим.-фарм. журнал. 1990. №1. С.41-42.
9. Пат. 14635А. Україна. Бюл. № 2. 6 с.
10. Shaban M.A.E., Morgaan A.E.A. Advanc. Heterocycl. Chem. 1999. V.73. P.131-176.
11. Десенко С.М., Орлов В.Д., Липсон В.В., Горбенко Н.И. и др. Хим.-фарм. журнал. 1994. №3. С.19-21.
12. Липсон В.В., Десенко С.М., Комыхов С.А., Орлов В.Д., Горбенко Н.И., Бородин О.В., Широкова М.Г., Карножицкая Т.М., Гарсиа Бакеро. Достижения современной фармации – в медицинскую практику. Харьков, Вид. УФА, 1996. С.50.
13. В.Д.Орлов, С.М.Десенко, К.А.Потехин, Ю.Т.Стручков. Химия гетероцикл. соед. 1988. №2. С.229-234.

14. Десенко С.М., Орлов В.Д., Шишкин О.В., Гетманский Н.В., Липсон В.В., Линдеман С.В., Стручков Ю.Т. Химия гетероцикл. соед. 1993. № 4. С.481-485.
15. Десенко С.М., Орлов В.Д. Азагетероциклы на основе ароматических непредельных кетонов. Харьков: Фолио, 1998. 148 с.

Поступила в редакцию 5 сентября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). V.V.Lipson, M.G.Shirobokova, T.M.Karnozhitskaya, V.V.Borodina. 2-Carboxy- and 2-Carbmethoxy derivatives of dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine.

A series of new dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives have been obtained by cyclocondensation of α,β -unsaturated ketones with 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxylic acid and its methyl ester, in order to investigate their antidiabetic properties. The structure of the synthesized compounds has been proved by spectral methods.

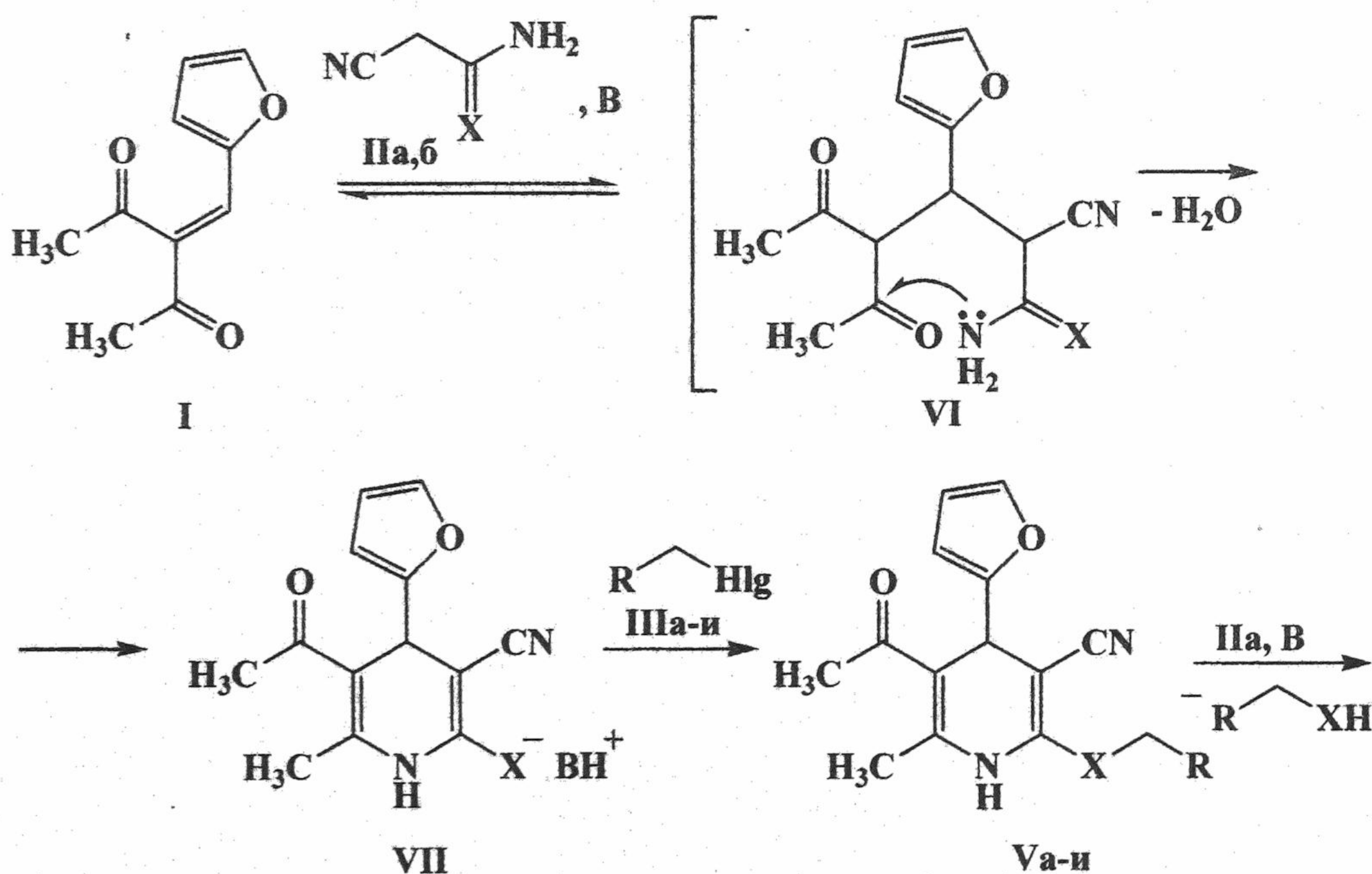
УДК 547.834.2:547.822.7:547.812

КОНКУРИРУЮЩИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ АДДУКТОВ РЕАКЦИИ МИХАЭЛЯ В 1,6-НАФТИРИДИНЫ, ПИРИДИНЫ И 4Н-ПИРАНЫ

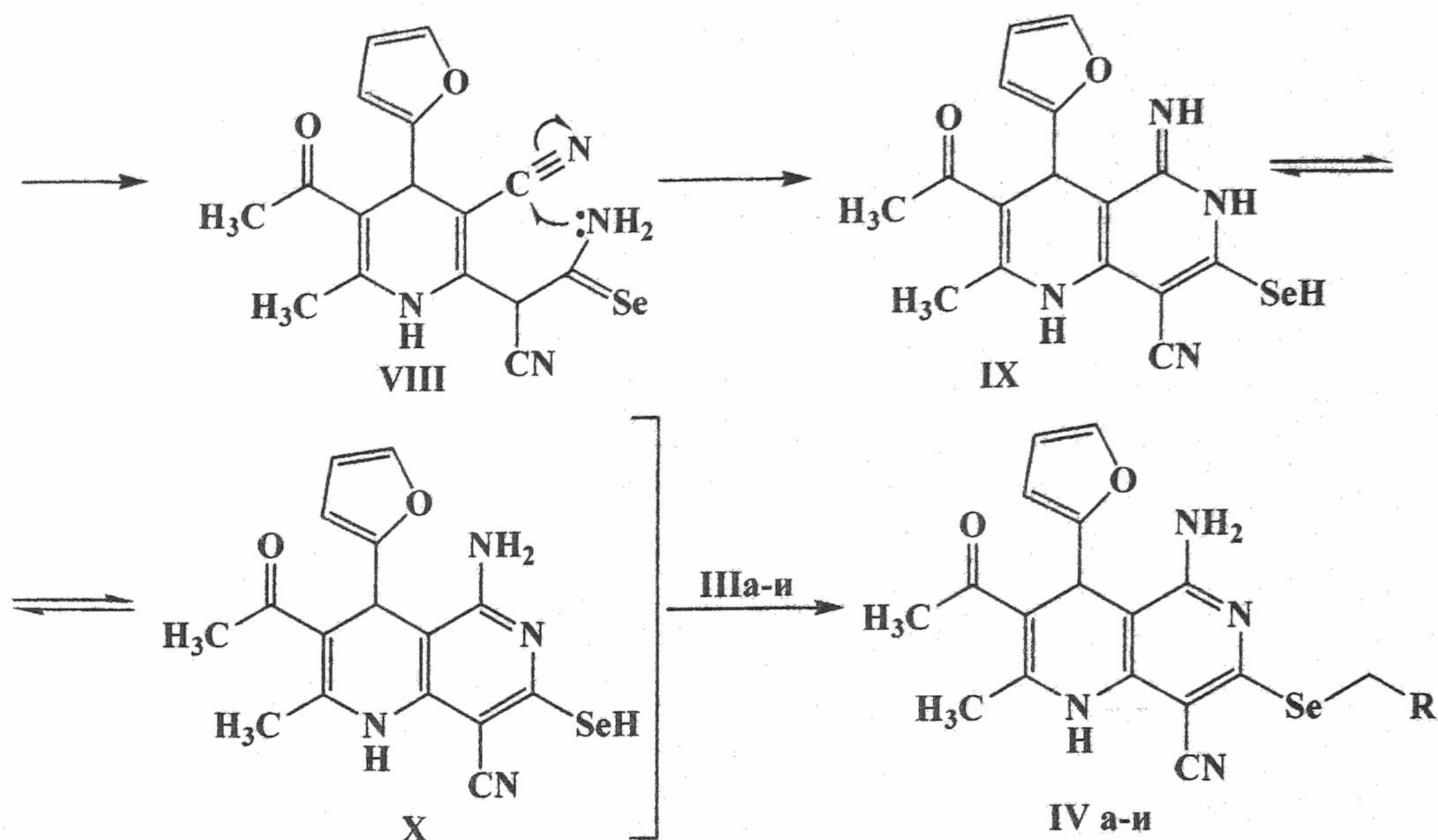
© 2000 С.В.Роман*, В.Д.Дяченко*

Разработан региоуправляемый синтез замещенных 1,6-нафтиридинов, пиридинов и 4Н-пиранов на основе реакции Михаэля: конденсацией 3-(2-фурфурилиден)ацетилацетона с цианотио(селено)ацетамидами и алкилгалогенидами, взаимодействием бензилиден- и 2-фурфурилиденцианоуксусных эфиров с цианоселеноацетамидом, реакцией 2-фурфурилиденмалононитрила с ацетоуксусным эфиром.

Успешная реализация одnoreакторной многокомпонентной циклоконденсации в синтезе ранее неизвестных замещенных 7-алкилселено-1,4-дигидро-1,6-нафтиридинов [1] обусловила необходимость поиска новых α,β -непредельных кетонов и их структурных аналогов, способных в однотипных условиях образовывать 1,6-нафтиридиновые системы. Одним из таких синтонов оказался 3-(2-фурфурилиден)ацетилацетон I. Взаимодействие его с цианоселеноацетамидом IIa и алкилгалогенидами IIIa-и в среде абсолютного этанола в атмосфере аргона при 20°C в присутствии двукратного избытка N-метилморфолина приводит к получению новых 1,6-нафтиридинов IVa-и (метод «а»). Последовательность стадий каскадной гетероциклизации логично вытекает из структур продуктов реакции и подтверждена встречным синтезом нафтиридина IVи с использованием вместо двукратного количества цианоселеноацетамида IIa эквимольных количеств цианотиоацетамида IIб и селеноамида IIa (метод «б»). Интересно, что в отсутствие тиоамида IIб в этой реакции выделен замещенный 2-бензилселено-1,4-дигидропиридин Vi.



* Луганский государственный педагогический университет им. Тараса Шевченко, 91011, Луганск, Оборонная-2



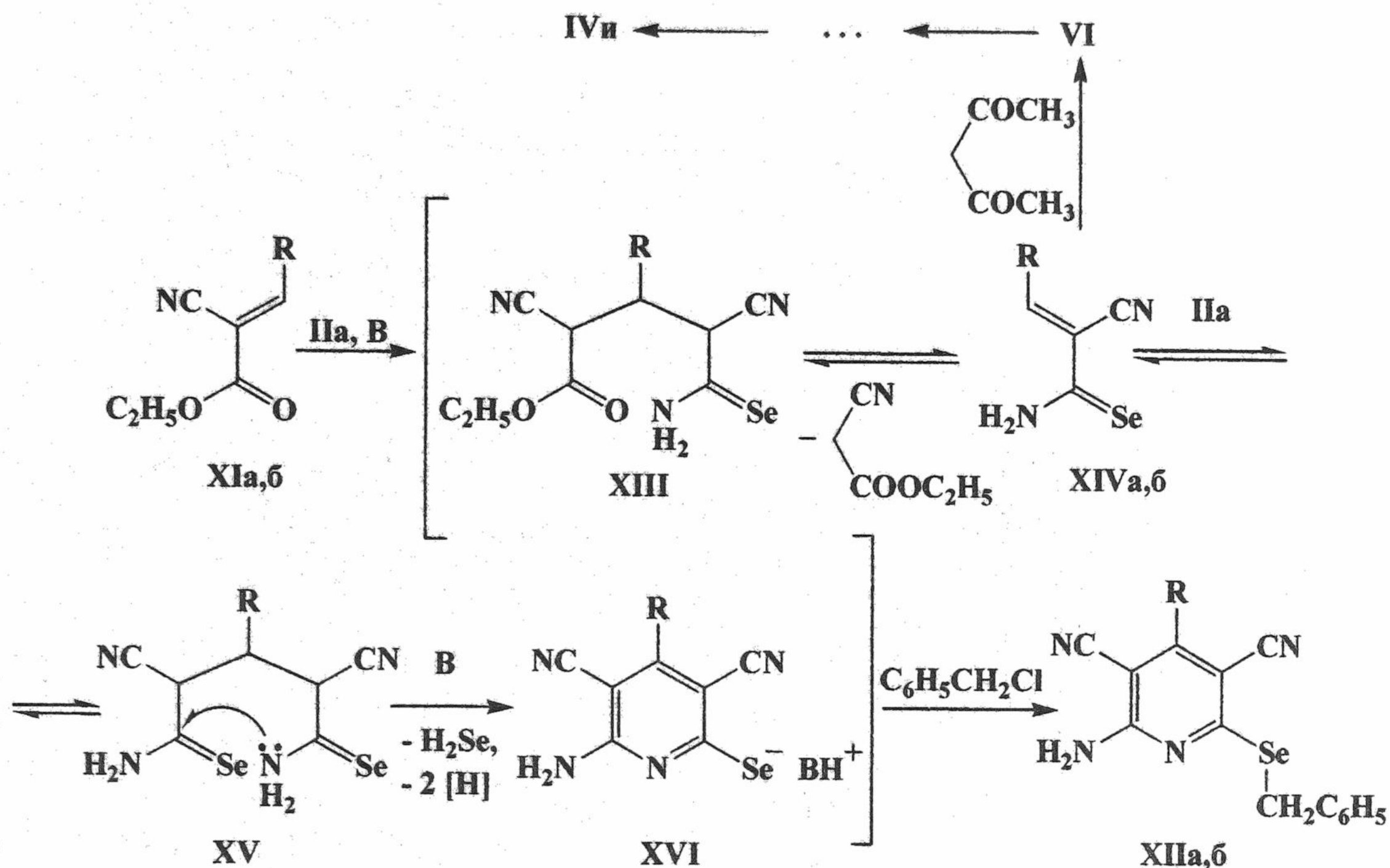
В = N-метилморфолин. II: а X = Se, б X = S. III-V: а R = H, Hlg = I; б $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, Br; в C_4H_9 , I; г C_8H_{17} , Br; д $(\text{CH}_2)_2\text{Br}$, Br; е $\text{CH}=\text{CH}_2$, Br; ж CONH_2 , Cl; з COOC_2H_5 , Cl (при R = COOCH_3); и C_6H_5 , Cl. V-VII: X = S, Se.

Построение 1,6-нафтиридинов IVa-и начинается с образования в ходе циклизации из аддукта Михаэля VI соли VII, подвергающейся региоселективному алкилированию галогенидами IIIa-и в эфиры Va-и. Последние далее реагируют со вторым эквивалентом селеноамида IIa по типу нуклеофильного винильного замещения. В ряду 1,4-дигидропиридинов реакции такого типа известны и наиболее легко осуществимы с 2-алкилселенопроизводными [2]. Возникший при этом аддукт VIII циклизуется в иминонафтиридин IX, находящийся в таутомерном равновесии с селенолом X. Последний стабилизируется алкилированием непрореагировавшей частью галогенидов IIIa-и в селениды IVa-и. Следует отметить, что в отсутствие алкилирующих агентов поликонденсация прекращается на стадии образования селенолата VII.

Заслуживает внимания факт переэтерификации метилового эфира монохлоруксусной кислоты IIIз в ходе синтеза нафтиридина IVз.

Введение в описываемую конденсацию винилогов карбонильных соединений — арил(гетарил)метиленицианоуксусных эфиров XIa,б неожиданно приводит к изменению ее направления. При этом получены пиридины XIIa,б. Логично предположить, что первоначально образующиеся аддукты Михаэля XIII не циклизуются, а в результате обмена метиленовыми компонентами [3,4] дают *in situ* новые олефины XIVa,б. В условиях реакции олефины XIV присоединяют второй эквивалент селеноамида IIa, образуя аддукты XV, циклоконденсирующиеся с одновременным дегидрированием в соли XVI, которые и подвергаются алкилированию бензилхлоридом.

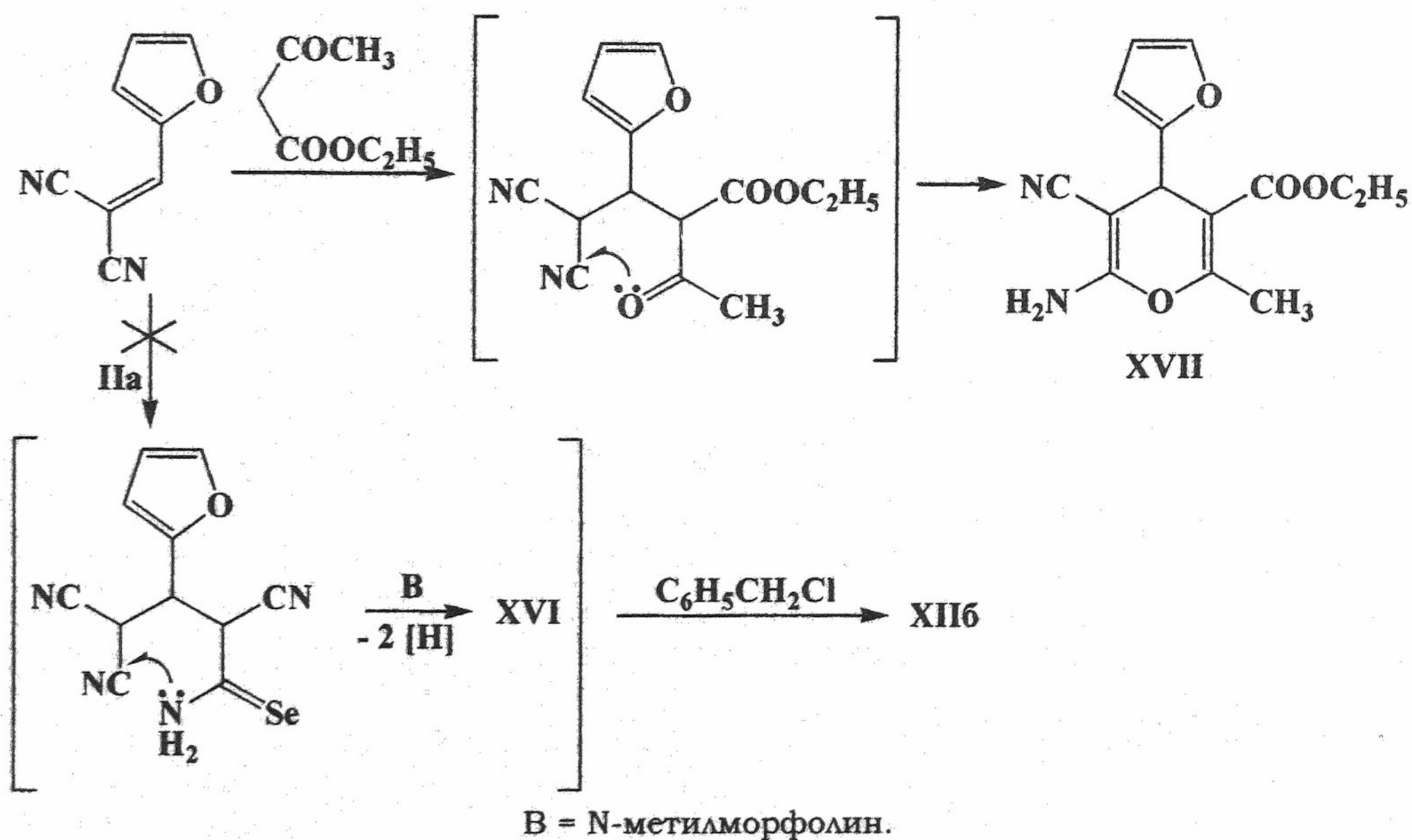
При использовании в конденсации с 2-фурфурилиденцианоуксусным эфиром XIб в качестве второй СН-компоненты ацетилацетона выделена смесь нафтиридина IVи и пиридина XIIб, разделенная перекристаллизацией из этанола (метод «в»). Это указывает на протекание на стадии образования олефина XIVб двух конкурирующих реакций Михаэля с образованием соответствующих аддуктов VI и XV. При этом аддукт VI трансформируется в нафтиридин IVи, а аддукт XV — в пиридин XIIб по уже рассмотренным выше направлениям. Большая нуклеофильность ацетилацетона объясняет преобладание 1,6-нафтиридина IVи в смеси продуктов.



XI, XII, XIV: а R = C₆H₅, б R = 2-фурил. В = N-метилморфолин.

Синтез нафтиридина IV_b независимым методом из 2-фурфурилиденцианоселеноацетамида XIV_b с применением ацетилацетона (метод «г») доказывает в случае винилога XI протекание реакции Михаэля по типу обмена метиленовыми компонентами.

Применительно к 2-фурфурилиденмалононитрилу дополнительное введение в реакцию эквимольного количества ацетоуксусного эфира определяет единственное направление реакции Михаэля – образование 4Н-пирана XVII, тогда как в его отсутствие выделен ожидаемый пиридин XII_b.



B = N-метилморфолин.

Строение полученных соединений подтверждено данными элементного (С, Н, N, Se) анализа и ПМР-спектроскопии (табл.1).

Таблица 1. Характеристики соединений IVa-з, XIIa,б и XVII*

Соединение	Выход, %	Т.пл., °С (**)	Брутто-формула	Спектр ПМР, δ, м.д., J/Гц
1	2	3	4	5
IVa	59	285-287 с разл.	$C_{17}H_{16}N_4O_2Se$	2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.37 (3H, с, SeCH ₃); 2.42 (3H, с, CH ₃ CO); 5.18 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.0); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.0, 2.1); 6.88 (2H, уш.с, NH ₂); 7.39 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.1); 8.69 (1H, с, NH)
IVб	54	205-207	$C_{20}H_{22}N_4O_2Se$	0.94 (6H, д, 2CH ₃ , J=6.0); 1.55-1.76 (3H, м, SeCH ₂ CH); 2.27 (3H, с, 2-CH ₃); 2.38 (3H, с, CH ₃ CO); 5.19 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.1); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.1, 2.1); 6.80 (2H, уш.с, NH ₂); 7.39 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.1); 8.67 (1H, с, NH)
IVв	56	226-228 (н-БуОН)	$C_{21}H_{24}N_4O_2Se$	0.89 (3H, т, CH ₃ , J=7.0); 1.28-1.46 (6H, м, (CH ₂) ₃); 1.71 (2H, т, SeCH ₂ , J=7.0); 2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.37 (3H, с, CH ₃ CO); 5.18 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.1); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.1, 2.1); 6.84 (2H, уш.с, NH ₂); 7.38 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.1); 8.68 (1H, с, NH)
IVг	61	148-150	$C_{25}H_{32}N_4O_2Se$	0.89 (3H, т, CH ₃ , J=7.0); 1.12-1.47 (14H, м, (CH ₂) ₇); 1.71 (2H, т, SeCH ₂ , J=7.0); 2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.38 (3H, с, CH ₃ CO); 5.18 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.2); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.2, 2.3); 6.84 (2H, уш.с, NH ₂); 7.38 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.3); 8.67 (1H, с, NH)
IVд	47	240-242 с разл. (н-БуОН)	$C_{19}H_{19}BrN_4O_2Se$	2.08-2.21 (4H, м, Se(CH ₂) ₂); 2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.38 (3H, с, CH ₃ CO); 2.53 (2H, т, CH ₂ Br, J=5.5); 5.19 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.1); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.1, 2.2); 6.86 (2H, уш.с, NH ₂); 7.39 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.2); 8.70 (1H, с, NH)

* Соединение IVи охарактеризовано нами ранее [5].

** Растворитель для кристаллизации.

Продолжение таблицы 1.

1	2	3	4	5
IVe	51	209-211 (n-BuOH)	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₂ Se	2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.38 (3H, с, CH ₃ CO); 3.87 (2H, д.д, SeCH ₂ , J=6.6); 5.00 (1H, д, =CH ₂ , ³ J _{шис} =9.5); 5.19 (1H, с, 4-H); 5.27 (1H, д, =CH ₂ , ³ J _{транс} =19); 5.91-6.04 (1H, м, =CH); 6.08 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.1); 6.26 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.1, 2.2); 6.94 (2H, уш.с, NH ₂); 7.39 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.2); 8.70 (1H, с, NH)
IVж	42	234-236 с разл.	C ₁₈ H ₁₇ N ₅ O ₃ Se	2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.38 (3H, с, CH ₃ CO); 3.69 (2H, с, SeCH ₂); 5.18 (1H, с, 4-H); 6.08 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.2); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.2, 2.2); 6.94 и 7.24 (по 1H, оба уш.с, CONH ₂); 7.03 (2H, уш. с, NH ₂); 7.39 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.2); 8.76 (1H, с, NH)
IVз	36	191-193 (MeOH)	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ Se	1.22 (3H, т, CH ₃ , J=7.0); 2.26 (3H, с, 2-CH ₃); 2.38 (3H, с, CH ₃ CO); 3.67 (2H, с, SeCH ₂); 4.04 (2H, к, OCH ₂ , J=7.0); 5.19 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.0); 6.25 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.0, 2.2); 6.94 (2H, уш.с, NH ₂); 7.38 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.2); 8.79 (1H, с, NH)
XIIa	60	207-209 (EtOH)	C ₂₀ H ₁₄ N ₄ Se	4.57 (2H, с, SeCH ₂); 7.16-7.41 (5H, м, C ₆ H ₅); 7.46-7.95 (7H, м, C ₆ H ₅ , NH ₂)
XIIб	63	225-227 (EtOH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₄ OSe	4.61 (2H, с, SeCH ₂); 6.77 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.0); 7.16-7.33 (3H, м, 4-H _{фурил} , NH ₂); 7.37-7.70 (5H, м, C ₆ H ₅); 8.03 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.1)
XVII	45	204-206 (EtOH)	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₄	1.18 (3H, т, CH ₃ , J=7.0); 2.30 (3H, с, 2-CH ₃); 4.09 (2H, к, OCH ₂ , J=7.0); 4.46 (1H, с, 4-H); 6.07 (1H, д, 3-H _{фурил} , J=3.1); 6.32 (1H, д.д, 4-H _{фурил} , J=3.1, 2.3); 6.83 (2H, уш.с, NH ₂); 7.46 (1H, д, 5-H _{фурил} , J=2.3)

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на блоке Кофлера. Спектры ПМР записаны в ДМСО-d₆ на приборе Bruker AM 300, внутренний эталон – ТМС. Индивидуальность соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UW-254 в системе ацетон-гептан (3:5), проявитель – пары йода.

Данные элементного анализа соответствуют вычисленным.

7-(R-Метилселено)-5-амино-3-ацетил-2-метил-4-(2-фурил)-8-циано-1,4-дигидро-1,6-нафтиридины (IVa-и)

А. Общая методика. Смесь 0.89 г (5 ммоль) кетона I, 1.47 г (10 ммоль) цианоселеноацетамида IIa и 1.05 мл (10 ммоль) N-метилморфолина в 15 мл абс. этанола при 20°C под аргоном перемешивали 10 минут, затем прибавляли 6 ммоль соответствующего ал-

килгалогенида Ша-и. Через 48-72 часов образовавшийся осадок отделяли и промывали этанолом.

Б. По этому методу нафтиридин IVи с выходом 38% получали на основе методики «А», используя вместо 10 ммоль селеноамида IIа 0.50 г (5 ммоль) цианотиоацетамида IIб и 0.74 г (5 ммоль) селеноамида IIа.

В. Смесь 0.96 г (5 ммоль) эфира XIб, 10 ммоль амида IIа, 0.51 мл (5 ммоль) ацетил-ацетона и 10 ммоль N-метилморфолина в 15 мл абс. этанола под аргоном при 20°C перемешивали 10 минут и прибавляли 0.69 мл (6 ммоль) бензилхлорида. Через 72 часа выделившийся осадок отделяли и промывали этанолом. Полученную смесь соединений IVи и XIIб разделяли перекристаллизацией из этанола. При этом выход нафтиридина IVи (нерастворившийся остаток) составил 42%, а пиридина XIIб – 19%.

Г. Смесь 1.13 г (5 ммоль) 2-фурфурилиденцианоселеноацетамида XIVб, 5 ммоль амида IIа, 5 ммоль ацетилацетона и 10 ммоль N-метилморфолина в 20 мл абс. этанола при 20°C под аргоном перемешивали 20 минут и прибавляли 6 ммоль бензилхлорида. Через 72 часа выделившийся осадок отфильтровывали, промывали этанолом. Получали нафтиридин IVи с выходом 56%.

4-R-6-Амино-2-бензилселено-3,5-дицианопиридины (XIIа,б)

Смесь 5 ммоль эфира XI, 10 ммоль селеноамида IIа и 10 ммоль N-метилморфолина в 15 мл абс. этанола при 20°C под аргоном перемешивали 10 минут и прибавляли 6 ммоль бензилхлорида. Через 48 часов образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали этанолом.

2-Амино-6-метил-4-(2-фурил)-3-циано-5-этоксикарбонил-4Н-пиран (XVII)

Смесь 0.72 г (5 ммоль) 2-фурфурилиденмалонитрила, 10 ммоль амида IIа, 0.65 мл (5 ммоль) ацетоуксусного эфира и 10 ммоль N-метилморфолина в 15 мл абс. этанола под аргоном при 20°C перемешивали 10 минут, затем прибавляли 6 ммоль бензилхлорида. Через 48 часов выделившийся осадок отделяли, промывали этанолом.

Литература

1. Дяченко В.Д., Роман С.В., Литвинов В.П. Изв. АН. Сер. хим. 2000. №1. С.121-124.
2. Кривоколыско С.Г., Шаранин Ю.А., Дяченко В.Д. Журн. общ. химии. 1995. Т.65. Вып.5. С.878.
3. Борисов В.Н. В кн. Современные проблемы органической химии /Под ред. К.А. Оглоблина. Л.: Изд. Ленинградского ун-та. 1975. С.89-106.
4. Дяченко В.Д. Дисс... докт. хим. наук. Москва. 1998. 500 с.
5. Роман С.В., Дяченко В.Д., Литвинов В.П. Химия гетероцикл. соед. 2000. №4. С.555-556.

Поступила в редакцию 22 августа 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). S.V.Roman, V.D.Dyachenko. The competitive transformations of adducts of Michael reaction in 1,6-naphthyridines, pyridines and 4H-pyrans.

The regiocontrolled synthesis of substituted 1,6-naphthyridines, pyridines and 4H-pyrans on the basis of Michael reaction was elaborated: by condensation of 3-(2-furfuryliden)acetylacetone with cyanothio(seleno)acetamides and alkyl halides, by interaction of ethyl benzyliden- and 2-furfurylidencyanoacetates with cyanoselеноacetamide, by reaction of 2-furfurylidенmalononitryle with ethyl acetoacetate.

УДК 547.572+547.772+541.128

ПОИСК НОВЫХ ЛЮМИНОФОРОВ С ЗАДАНЫМИ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ И ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ.
V. 1-АРИЛ-3-[4-(R-САЛИЦИЛИДЕНАМИНО)ФЕНИЛ]-5-ФЕНИЛ-2-ПИРАЗОЛИНЫ

© 2000 А.П.Шкумат

Реакцией 1-арил-3-(4-аминофенил)-5-фенил-2-пиразолинов с замещенными салициловыми альдегидами синтезированы 1-арил-3-[4-(R-салицилиденамино)фенил]-5-фенил-2-пиразолины. Обсуждены данные спектров поглощения и люминесценции.

Обладающие рядом специфических физических и химических свойств азометины (основания Шиффа) вызывают неослабевающий интерес исследователей в связи с разнообразием возможностей целенаправленного синтеза с использованием уникальных химических превращений экзоциклической C=N- группы [1, 2], а такие анилы, как замещенные салицилиденанилины – из-за характерных люминесцентных свойств и практической значимости [3].

Ранее [4, 5] нами опубликованы результаты исследования азометиновых аналогов 1,5-дифенил-3-стирил-2-пиразолина – 1-арил-3-(R-салицилиденамино)-5-R-2-пиразолинов и 3-(N-арилформимидоил)-4-гидрокси-R-кумаринов. В отличие от замещенных 1,5-дифенил-3-стирил-2-пиразолина – эффективных люминофоров как в растворе, так и в твердом состоянии исследованные соединения обладают интенсивной люминесценцией, главным образом, в твердом состоянии. Известно [3], что большинство бензальанилинов не люминесцирует ни в кристаллическом состоянии, ни в жидких растворах, однако в замороженных растворах или при специфическом замещении люминесценция наблюдается, например, для 4-трифторметилсульфонил-4-диметиламинобензальанилина. Для салицилиденариламинов [3 - 5], вероятно, при формировании кристаллов уплотняется хромофорная система, упрочняется внутримолекулярная водородная связь (ВВС) и они эффективно люминесцируют.

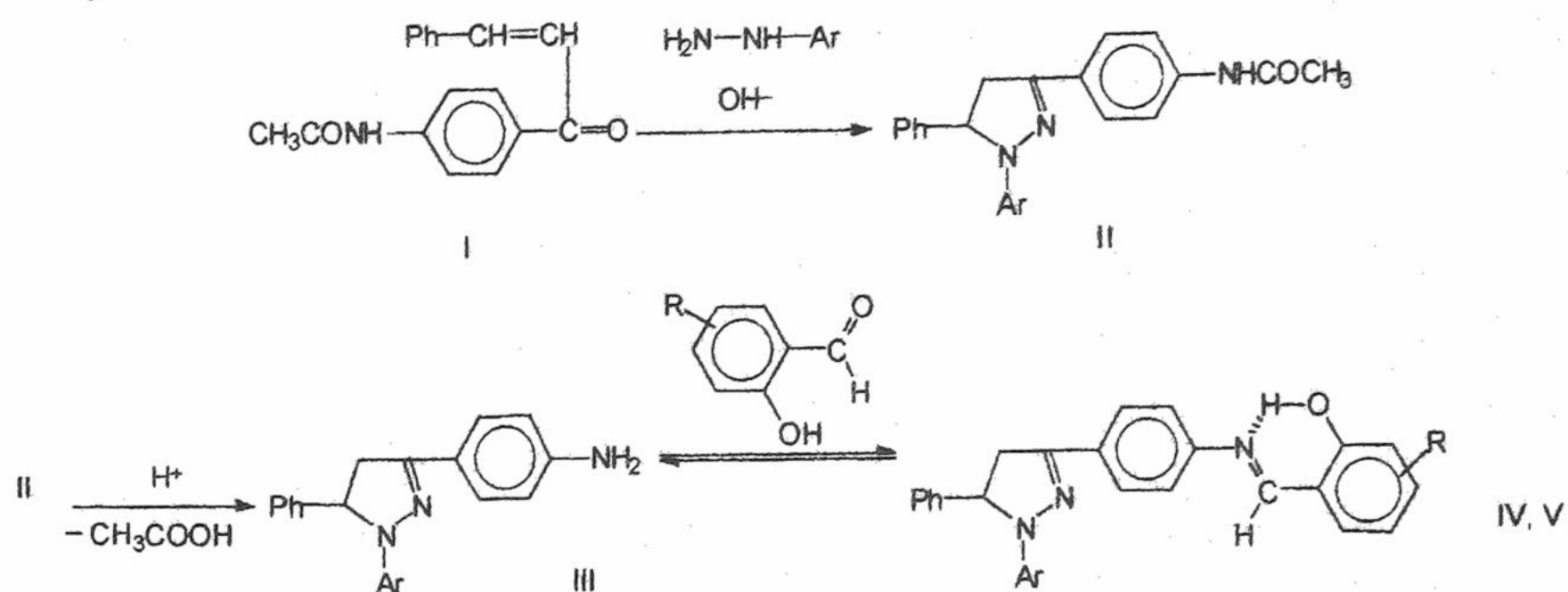
Представляло интерес исследовать спектрально-люминесцентные свойства 1,5-диарил-3-[4-(R-салицилиденамино)фенил]-2-пиразолинов, отличающиеся от ранее изученных 1-арил-3-(R-салицилиденамино)-5-R-2-пиразолинов наличием фениленового мостика. В намеченных для исследования соединениях фрагмент R-салицилиден=N- (Sal=N-) следует рассматривать как заместитель в 1,3,5-трифенил-2-пиразолине, и интересно выяснить влияние указанного фрагмента на спектрально-люминесцентные свойства целевых продуктов.

Оптимальный способ синтеза целевых соединений представлен на схеме 1 (см. экспериментальную часть, табл. 1).

Стадия взаимодействия R-салициловых альдегидов и аминопиразолинов (III) обратимая и поэтому для полноты протекания процесса требуется избыток салицилового альдегида. Важным также является выбор растворителя для синтеза и кристаллизации. Как уже отмечалось в сообщении III [4], наиболее универсальным и экономичным растворителем при взаимодействии R-салициловых альдегидов и аминосодержащей компоненты является диметилформамид (ДМФА). Это относится и к синтезу анилов в настоящей работе. Во избежание гидролиза азометинов при перекристаллизации использовались только апротонные растворители (ароматические – бензол, толуол, ксилолы, а также этилацетат и диоксан). Синтезированные соединения представляют собой интенсивно окрашенные кристаллические вещества.

В ИК спектрах синтезированных N-ацетил-2-пиразолинов IIa, IIб и IIв, как и следовало ожидать, присутствуют полосы поглощения $\tilde{\nu}_{C=O}$ при 1668, 1666 и 1665 см^{-1} , соответственно. Для аминопиразолинов IIIa, IIIб и IIIв в области 3330-3445 см^{-1} присутствуют характерные полосы поглощения $\tilde{\nu}_{NH_2}^a$ и $\tilde{\nu}_{NH_2}^s$. Колебания C=N- группы 2-пиразолинового цикла ($\tilde{\nu}_{C=N}^{ГП}$), к сожалению, маскируются колебаниями фенилов ($\tilde{\nu}_{C=C}^{aP}$). Для доказатель-

ства строения целевых продуктов IV и V могут быть приняты во внимание валентные колебания экзоциклической C=N- группы ($\tilde{\nu}_{C=N}$) при 1615-1632 cm^{-1} и достаточно устойчивые по положению деформационные колебания метиленовой группы пиразолинового цикла (δ_{CH_2}) при 1445-1465 cm^{-1} .



R = 4-(C₂H₅)₂N-; 4-HO-5-н.С₆H₁₃-; 4-СН₃О-; 4-НО-;H; 5-Br; 5-О₂N-; 5,6-(—СН=СН)₂-.
IV. Ar = Ph; Va. Ar = 4-СН₃-Ph-; Vб. Ar = 4-Cl-Ph-.

Схема 1.

Электронные спектры поглощения соединений II – V изучены в ацетонитрильных растворах, а спектры люминесценции – еще и в твердом состоянии – путем нанесения их на стеклянную пластинку. По сравнению с 1,5-дифенил-3-салицилиденамино-2-пиразолином [4] (табл.1, соединение VI) синтезированный в настоящей работе 1,5-дифенил-3[4-(салицилиденамино)-фенил]-2-пиразолин (соединение IVд) поглощает и испускает заметно в более коротковолновой области, что может указывать на то, что фрагмент Sal=N– слабо сопряжен с основной хромофорной системой Ph–C=N–N–Ph. В отличие от ранее изученных соединений азометинового ряда [4, 5], люминофоры IV и V люминесцируют не только в твердом состоянии, но и в растворах. При этом обращает внимание тот факт, что соединения IVд, IVе, IVж, IVз, Va и Vб, не содержащие в альдегидной составляющей электронодонорных групп, флуоресцируют с высоким квантовым выходом (ϕ_f). Все соединения характеризуются нормальным стоксовым сдвигом ($\Delta\tilde{\nu}$) полосы флуоресценции относительно полосы поглощения, часто в первых колебательная структура проявляется отчетливее (табл.1).

Эффективная люминесценция соединений II – V создает предпосылки для использования их как люминофоров для практических целей, а также в качестве исходных соединений для модификации их строения с использованием уникальных возможностей экзоциклической C=N– группы.

Экспериментальная часть

ИК-спектры поглощения халконов [1], 2-пиразолинов (II – V) (в таблетках KBr) измеряли на ИК-спектрометре IR-75. Электронные спектры 2-пиразолинов (II – V) измеряли в растворе ацетонитрила на спектрофотометре «Hitachi - 3210», а спектры флуоресценции этих соединений в растворе ацетонитрила и в твердом состоянии на спектрофлуориметре «Hitachi - 4010» (длина волн возбуждения – $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$).

Синтезированные соединения проанализированы на содержание азота – полученные данные в пределах допустимых отклонений (0.2%) соответствуют вычисленным.

Синтез 1-(4-N-ацетиламинофенил)-3-фенилпропенона (I)

Соединение I получали путем кротоновой конденсации N-ацетил-4-амино-ацетофенона и бензальдегида (в этиловом спирте) в присутствии каталитических количеств едкого кали (водный 10%-ный раствор). Выход 98%. T_{пл} 154 °С. ИКС (KBr): 1673 и 1655 ($\tilde{\nu}_{C=O}$); 983 ($\delta_{\text{CH=CH}}^{\text{транс}}$).

Таблица 1. 1-(4-R₁-фенил)-5-фенил-3-[4-(N-X-аминофенил)-2-пиразолины (II и III)
1-(4-R₁-фенил)-5-фенил-3-[4-(R₂-салицилиденанино)фенил]-2-пиразолины (IV и V)

№ соединения	R ₁	R ₂ или X	Данные по синтезу				ИК спектры (см ⁻¹) (табл. КВГ)			ЭСП (CH ₃ -CN) $\tilde{\nu} \cdot 10^{-3}$, см ⁻¹	Люм. в р-ре CH ₃ CN (в тв. сост.) $\tilde{\nu} \cdot 10^{-3}$, см ⁻¹	$\Delta\tilde{\nu} \cdot 10^{-3}$, см ⁻¹	φ_f
			Метод	t, ч	Выход %	T _{пл} , °C	$\tilde{\nu}_{\text{CH}}$	$\tilde{\nu}_{\text{C=N}}$	δ_{CH_2}				
IIa	H	CH ₃ CO	A	1.0	71	242	3025	-	1455	27.4	<u>22.2</u> (21.1)	5.2	0.63
IIIa	H	H	A	6	98	123	3020	-	1455	27.7	<u>22.8</u> (21.8)	4.9	0.57
IIб	4-CH ₃	CH ₃ CO	B	0.1	10	171	3030	-	1455	27.0	<u>20.8</u> (20.4; 17.1)	6.2	0.2
IIIб	4-CH ₃	H	B	0.3	10	144	3025	-	1450	27.3	<u>22.2</u> (21.1; 18.3)	5.1	0.46
IIв	4-Cl	CH ₃ CO	B	0.6	38	209	3020	-	1458	27.4	<u>22.2</u> (21.4; 17.9)	5.2	0.19
IIIв	4-Cl	H	A	6	85	153	3015	-	1452	27.6	<u>22.7</u> (22.3; 21.3)	5.9	0.39
IVa	H	4-N-(C ₂ H ₅) ₂	A	0.3	46	175	3030	1630	1448	26.3	<u>20.2; 19.3</u> (18.1)	7.0	0.05
IVб	H	4-НО-5-н. C ₆ H ₁₃	B	48	25	167	3025	1632	1468	25.0	<u>19.5</u> (16.9)	5.5	0.02
IVв	H	4-CH ₃ O	B	0.2	85	184	3028	1623	1450	24.2	<u>17.6</u> (18.1; 17.2)	6.6	0.03
IVг	H	4-OH	B	0.02	60	147	3030	1629	1445	25.7	- (15.7)	-	-
IVд	H	H	A	0.4	76	183	3035	1615	1453	24.1	<u>17.8</u> (18.1; 17.1)	6.3	0.41
IVе	H	5-Br	B	0.1	66	190	3030	1620	1452 1474	25.0	<u>17.9</u> (17.2; 16.3)	7.1	0.34
IVж	H	5-NO ₂	B	0.1	68	221	3020	1620	1485	23.1	<u>16.1</u> (14.8)	7.0	0.33
IVз	H	5,6-CH=CH-CH=CH-	B	0.3	85	245	3040	1620	1450	23.8	<u>15.5</u> (16.5)	8.3	0.1
Va	4-CH ₃	H	B	0.02	60	200	3030	1610	1445	25.0	<u>18.7</u> (17.6; 16.7)	6.3	0.34
Vб	4-Cl	H	B	0.02	73	192	3020	1615	1445	24.2	<u>18.1</u> (17.3; 16.1)	6.1	0.32
VI [4]	H	H								21.1	- (17.1)		

Синтез 1-арил-5-фенил-3-(4-N-ацетиламинофенил)-2-пиразолинов (II)

Метод А. (Арил=фенил). Эквимолярные количества N-ацетил-4-аминоацетофенона (0.112 моля) и бензальдегида (0.112 моля) в метаноле (100 мл) нагревали с обратным холодильником и в один прием добавляли суспензию насыщенного при 70°C водного гидроксида бария (30 мл). Смесь кипятили 0.5 часа, затем прибавляли эквимолярное количество фенилгидразина (основания) и кипячение продолжали в течение 1 часа, осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали. Выход 71%. T_{пл} 242°C (диоксан), что соответ-

ствуется литературным данным [6]. ИКС (КВг): 3313 ($\tilde{\nu}_{\text{NH}}$); 3025 ($\tilde{\nu}_{\text{CH}}^{\text{ар}}$); 1668 ($\tilde{\nu}_{\text{C=O}}$); 1595 ($\tilde{\nu}_{\text{C=C}}^{\text{ар}}$, $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}^{\text{ГН}}$); 1455 (δ_{CH_2}). Аналогичный продукт получен взаимодействием соединения I и фенилгидразина в среде MeOH с использованием основных катализаторов.

Метод Б. Смесь, состоящую из соединения I, солянокислого 4-R-фенилгидразина (избыток 30%) и ледяной уксусной кислоты, кипятили в течение 0.1 – 0.6 часа. Целевой продукт выделяли, перекристаллизовывали.

Арил = 4-толил : Выход - 34%. $T_{\text{пл}} = 169-171^\circ\text{C}$.

ИКС: 3318 ($\tilde{\nu}_{\text{NH}}$); 3030 ($\tilde{\nu}_{\text{CH}}^{\text{ар}}$); 1666 ($\tilde{\nu}_{\text{C=O}}$); 1595 ($\tilde{\nu}_{\text{C=C}}^{\text{ар}}$ и $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}^{\text{ГН}}$); 1455 (δ_{CH_2}).

Арил = 4-хлорфенил : Выход - 38%. $T_{\text{пл}} = 207-209^\circ\text{C}$.

ИКС: 3300 ($\tilde{\nu}_{\text{NH}}$); 3020 ($\tilde{\nu}_{\text{CH}}^{\text{ар}}$); 1665 ($\tilde{\nu}_{\text{C=O}}$); 1595 ($\tilde{\nu}_{\text{C=C}}^{\text{ар}}$ и $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}^{\text{ГН}}$); 1458 (δ_{CH_2}).

Синтез 1-арил-5-фенил-3-(4-амнофенил)-2-пиразолинов (III)

Метод А. Соединения III получали путем гидролиза 1-арил-5-фенил-3-(N-ацетил-4-аминофенил)-2-пиразолинов в смеси этанол – концентрированная соляная кислота (3:1) при кипячении с обратным холодильником в течение 6 часов. Горячую реакцию смесь нейтрализовывали 25%-ным раствором водного аммиака, смесь нагревали с обратным холодильником в течение 0.1 часа и оставляли на 10 часов. Отфильтрованный осадок перекристаллизовывали из 70%-ного этанола.

Арил = фенил : Выход - 98%. $T_{\text{пл}} = 121-123^\circ\text{C}$.

ИКС: 3445, 3355 ($\tilde{\nu}_{\text{NH}_2}$); 3020 ($\tilde{\nu}_{\text{CH}}^{\text{ар}}$); 1595 ($\tilde{\nu}_{\text{C=C}}^{\text{ар}}$ и $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}^{\text{ГН}}$); 1455 (δ_{CH_2}).

Арил = 4-хлорфенил : Выход - 85%. $T_{\text{пл}} = 151-153^\circ\text{C}$.

ИКС: 3318 ($\tilde{\nu}_{\text{NH}_2}$); 3015 ($\tilde{\nu}_{\text{CH}}^{\text{ар}}$); 1595 ($\tilde{\nu}_{\text{C=C}}^{\text{ар}}$ и $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}^{\text{ГН}}$); 1468, 1452 (δ_{CH_2}).

Метод Б. Соединение III (арил = 4-толил) получали гидролизом соответствующего 2-пиразолина в среде уксусной кислоты в присутствии каталитического количества серной кислоты (100:1) при кипячении с обратным холодильником в течение 0.3 часа. Нейтрализацию охлажденной реакционной смеси проводили насыщенным раствором кальцинированной соды. Выделенный осадок перекристаллизовывали из 70 %-ного этанола. Выход - 10%.

$T_{\text{пл}} = 143-144^\circ\text{C}$.

ИКС: 3300 ($\tilde{\nu}_{\text{NH}_2}$); 3025 ($\tilde{\nu}_{\text{CH}}^{\text{ар}}$); 1610 ($\tilde{\nu}_{\text{C=C}}^{\text{ар}}$ и $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}^{\text{ГН}}$); 1450 (δ_{CH_2}).

Синтез 1-арил-5-фенил-3-[4-(R-салицилиденамино)фенил]-2-пиразолинов (IV – V)

Целевые основания Шиффа получали взаимодействием соединений III и R-салициловых альдегидов взятых в отношении 1:2 в среде этилового спирта в присутствии каталитических количеств раствора едкого натра (метод А), или в среде этилового спирта (метод Б), или в среде диметилформамида (метод В) при непродолжительном кипячении (1-10 мин). Выделенный продукт перекристаллизовывали из апротонных растворителей (бензол, ксилолы, этилацетат, толуол). Подробные сведения о синтезе соединений IV-V (метод, время реакции – t, выход, $T_{\text{пл}}$) приведены в табл.1.

Литература

1. Минбаев Б.У. Шиффовы основания. Алма-Ата: Наука. 1989. 140 с.
2. Минбаев Б.У., Яшнова И.И. Физико-химические свойства шиффовых оснований. Алма-Ата: Наука. 1990. 232 с.
3. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. Л: Химия. 1984. 336 с.
4. Шкумат А.П. Вестник Харьковского университета. 1999. Химия. № 437. Вып. 3(26). С.112–114.
5. Шкумат А.П. Вестник Харьковского университета. 1999. Химия. № 454. Вып. 4(27). С.150–153.
6. Rainford L.C., Davis H.L. J. Amer. Chem. Soc. 1928, V.50, №1, P.152–162.

Поступила в редакцию 6 октября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). A.P.Shkumat. The search of new luminophores with predetermined physicochemical and chemical properties. V. 1-Aryl-3-[4-(R-salicylideneamino)phenyl]-5-phenyl-2-pyrazolines.

The 1-aryl-3-[4-(R-salicylideneamino)phenyl]-5-phenyl-2-pyrazolines were prepared by the reaction of 1-aryl-3-(4-aminophenyl)-5-phenyl-2-pyrazolines with R-salicylaldehyde. The data of the absorption and luminescence spectra are discussed.