

На правах рукописи

Работа выполнена в Новосибирском Институте органической химии
им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук

Полиенко Юлия Федоровна

НОВЫЕ pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ СПИНОВЫЕ ЗОНДЫ И МЕТКИ:
СИНТЕЗ И СВОЙСТВА

(02.00.03 - органическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск - 2009

Научные руководители: доктор химических наук,
профессор Григорьев И. А.

кандидат химических наук,
Войнов М. А.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Василевский С. Ф.

кандидат химических наук
Тормышев В. М.

Ведущая организация: Международный Томографический
центр

Защита состоится «__» _____ 2009 г. в _____ на заседании
диссертационного совета Д 003.049.01 в Новосибирском институте органической
химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, проспект
акад. Лаврентьева, 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского института
органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН.

Автореферат разослан «__» ____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д. х. н.

Петрова Т. Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Метод определения локальных значений рН при помощи нитроксильных радикалов и спектроскопии ЭПР был разработан в начале 1980-х годов. Благодаря неинвазивности и высокой чувствительности, обеспечиваемой ЭПР-спектроскопией, метод позволяет преодолеть многие из ограничений, связанных с использованием других методов определения концентрации протонов, что делает его незаменимым, в частности, для исследований *in vivo*. Метод нашел применение в изучении процессов, связанных с переносом протона, таких как трансмембранный протонный транспорт в модельных системах, поверхностный потенциал и полярность мембран и протеинов, кислотность внутри пор ионообменных смол, а также на поверхности раздела фаз твердое тело – жидкость. Дальнейший прогресс в развитии метода будет определяться наличием новых подходов к синтезу нитроксильных радикалов с рН-зависимым спектром ЭПР, обладающих свойствами, ориентированными на решение конкретных аналитических задач.

Наиболее широкое применение в области биофизических исследований с применением спектроскопии ЭПР нашли амидины – производные нитроксильных радикалов ряда 3-имидазолин-1-оксида (4-R-амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксилы). Разработка методов модификации заместителя при *экзо*-циклическом атоме азота амидиновой группы, введения второго заместителя, несущего функциональную группу, к *экзо*-циклическому атому азота, а также метода расщепления оксадиазолонового цикла, который не затрагивал бы чувствительные к щелочному гидролизу функциональные группы в самом заместителе R, позволили бы значительно расширить доступный набор рН-чувствительных спиновых зондов амидинового ряда.

Цель работы - разработка подходов к синтезу новых нитроксильных радикалов, обладающих, наряду с рН-зависимым спектром ЭПР, набором физико-химических параметров (таких как липофильность, pK_a , Δa_N , наличие тех или иных функциональных групп, способных к афинному или ковалентному связыванию с исследуемыми объектами или частями исследуемых молекул) варьируемых в широком диапазоне значений.

Научная новизна и практическая значимость. Разработан простой, эффективный и воспроизводимый метод синтеза 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксида, заключающийся в конденсации 2-гидроксиламино-2-метилпропаналь оксима с 2,2-диалкоксипропаном в присутствии эквимолярного количества уксусной кислоты. Преимущество разработанной методики состоит в возможности использования, наряду с 2,2-диэтоксипропаном, более дешевого 2,2-диметоксипропана.

Впервые предложен подход к синтезу новых 3-имидазолиновых нитроксильных радикалов, содержащих N',N' -дизамещенную амидиновую группу в составе имидазолинового гетероцикла. Подход основан на алкилировании диамагнитных 4-R-амино-1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолинов этиловым эфиром бромуксусной кислоты и последующем окислении продуктов алкилирования в соответствующие нитроксильные радикалы и позволяет обойти трудности, связанные с алкилированием амидиновой группы в составе нитроксильного радикала. Обнаружено, что вторичная амидная группа

отличается высокой устойчивостью в условиях окисления (H_2O_2/Na_2WO_4), что позволило использовать ее в качестве защитной группы для карбоксильной группы. Подход позволяет ввести в молекулу нитроксильного радикала-амидина различные функциональные группы, такие как $COOCH_3$, $CONHCH_3$, $COOH$. Обнаружено, что реакция алкилирования этиловым эфиром бромуксусной кислоты проходит региоселективно и приводит к продукту *экзо*-N-алкилирования.

Разработан метод синтеза новых имидазолиновых радикалов, основанный на нуклеофильном замещении галогенида в *экзо*-N-галогеналкильном заместителе 1-(2-бромэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиа-зол-2-она. В этом методе оксикарбонильный фрагмент оксадиазолонового гетероцикла играет роль “защитной группы” для амидинового фрагмента.

Показано, что использование оксадиазолонового цикла в качестве предшественника амидиновой группы позволяет осуществить модификацию N-алкильного заместителя без осложнений, связанных с реакцией внутримолекулярного алкилирования эндоциклического атома азота амидиновой группы *экзо*-N-галогенэтильным фрагментом. В рамках данного подхода были синтезированы производные нитроксильного радикала-амидина, содержащие в *экзо*-N-этильном фрагменте такие функциональные группы как CN, N_3 , а также ряд производных с рН-зависимым спектром ЭПР, полученных в результате превращения азидоэтильного производного в условиях реакции Штаудингера. Данный подход был использован в синтезе рН-чувствительных нитроксильных радикалов-дисульфидов – парамагнитных лигандов для изучения свойств границы раздела органического монослоя, стабилизирующего золотые наночастицы, и водной фазы.

Изучена реакция 1-(2-R)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-она со слабоосновными нуклеофильными реагентами, такими как NaN_3 , NaCN, KF, KBr, KCl и $NaNO_2$. Показано, что, как и в случае с NaOH и CH_3ONa , реакция приводит к расщеплению оксадиазолонового цикла с образованием *экзо*-N-замещенных амидинов. Установлено, что слабоосновные нуклеофилы могут с успехом применяться к субстратам, содержащим заместители (CN, COOEt), чувствительные к атаке такими нуклеофилами, как NaOH и CH_3ONa . Изучено влияние природы нуклеофила на ход реакции раскрытия оксадиазолонового цикла. Обнаружено, что реакционная способность нуклеофилов в ДМСО меняется в ряду $F^- > CN^- > N_3^- > NO_2^- > Cl^- > Br^-$ и качественно коррелирует с их основностью (нуклеофильностью) в этом растворителе.

Показано, что все синтезированные нитроксильные радикалы обладают рН-зависимым спектром ЭПР и значениями pK_a , лежащими в интервале от 2.8 до 12.5 единиц рН.

Апробация работы. Основные результаты обсуждены на Объединенном семинаре НИОХ СО РАН; отдельные части работы были представлены на Молодежных научных школах-конференциях по органической химии (Санкт-Петербург 2002, Новосибирск 2002, Новосибирск 2003), Всероссийских и

международных конференциях (Новосибирск 2005, Новосибирск 2007, США 2005, США 2007, США 2008).

Публикации. Основной материал диссертации опубликован в 5 статьях и тезисах 9 докладов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературных данных, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (209 наименований). Работа содержит 4 схемы, 11 таблиц и 20 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность выбранной темы, показаны ее научная и практическая значимость, определены объекты и цели исследования.

Первая глава является обзором литературных данных и посвящена структурным требованиям, проблемам молекулярного дизайна и синтетическим подходам к синтезу нитроксильных радикалов с pH-зависимым спектром ЭПР.

Вторая глава - обсуждение полученных результатов. Описан усовершенствованный метод синтеза 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксида – диамагнитного предшественника 2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксид-1-оксила.

Третья глава - обсуждение полученных результатов, включает следующие разделы: Нуклеофильное замещение атома брома в 1-(2-бромэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-оне; Спектры ЭПР синтезированных нитроксильных радикалов; Термолитическое и нуклеофильное раскрытие оксадиазолонового гетероцикла в 1-R-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-онах; Нитроксильные радикалы-дисульфиды с pH-зависимым спектром ЭПР и их использование для исследования свойств золотых наночастиц.

Четвертая глава - обсуждение полученных результатов. Глава посвящена синтезу N',N'-дизамещенных 4-амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксидов, основанному на алкилировании диамагнитных 4-R-амино-1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолинов.

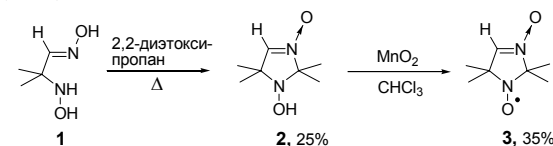
Пятая глава - экспериментальная часть. В ней представлены данные по использованным материалам, оборудованию, приведены методики проведения экспериментов и синтеза соединений, а также данные ЯМР, ЭПР, масс-, УФ- и ИК-спектров, РСА, температуры плавления и данные элементного анализа.

Новые pH-чувствительные спиновые зонды и метки: синтез и свойства

1.1. Усовершенствованная методика синтеза 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксида – диамагнитного предшественника 2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксид-1-оксила

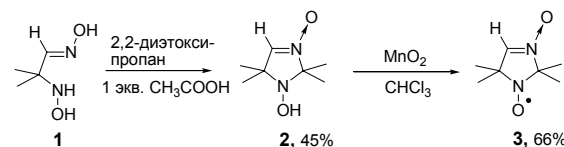
Важной стадией синтеза N'-монозамещенных амидинов является реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения изоцианатов RNCО к нитроксильному радикалу альдонитрону 2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксид-1-оксиду **3**. Существующий на настоящий момент способ синтеза диамагнитного

предшественника этого соединения – 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксида **2** – отличается совершенно неудовлетворительной воспроизводимостью и низким выходом, не превышающим 25%, что вызвало определенные трудности уже на начальном этапе работы. Несмотря на широкое синтетическое и аналитическое применение названного соединения, в литературе описан только один способ его синтеза. Этот способ основан на конденсации 2-гидроксиамино-2-метилпропаналь оксима **1** (ГАО) с 2,2-диэтоксипропаном (ДЭП).



Ранее было обнаружено, что использование ацетатов гидроксиминооксидов вместо свободного ГАО в реакциях с ДЭП

приводит к увеличению выхода продукта конденсации, хотя ацетат ГАО **1** ранее никогда не был использован для получения гидроксиминооксида **2**. Нами предложено проводить конденсацию ГАО **1** с ДЭП в присутствии эквимолярного количества уксусной кислоты. Это позволило увеличить выход целевого продукта до 45%.



Наблюдаемый эффект связан, очевидно, с тем, что в присутствии уксусной кислоты происходит протонирование

алкоксигруппы ацетата ацетона, что приводит к возникновению хорошо уходящей группы и значительно облегчает атаку неподеленной пары атома азота гидроксиминоаминовой группы ГАО на атом углерода ацетата ацетона (см. **Схему 1**).

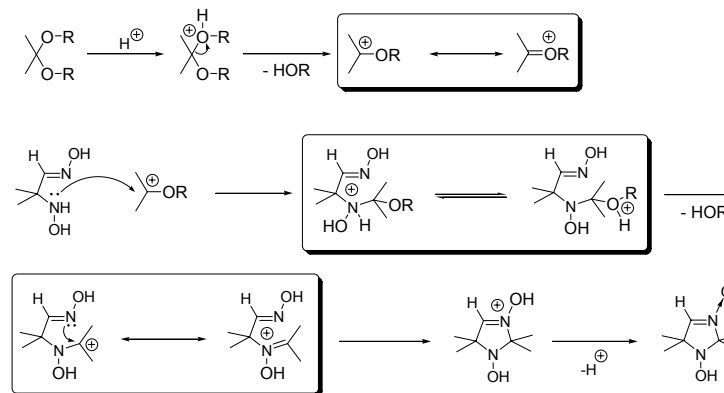


Схема 1

Удаление высококипящих компонентов из реакционной смеси при пониженном давлении и последующая обработка остатка сухим эфиром

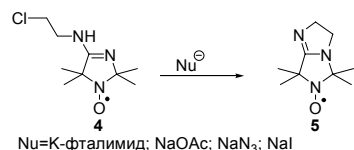
позволяет получить кристаллический продукт с высоким содержанием основного вещества **2** (96% согласно данным ВЭЖХ). Такой вариант обработки реакционной смеси обеспечивает 100%-ную воспроизводимость результатов при проведении реакции.

Обнаруженный каталитический эффект уксусной кислоты позволяет использовать в синтезе гидросиламина **2** значительно более дешевый 2,2-диметоксипропан (ДМП) вместо ДЭП. ДМП ранее никогда не использовался в конденсациях с α -ГАО. В отсутствие ледяной уксусной кислоты реакция ГАО **1** с ДМП не происходит.

При оптимизации условий конденсации было обнаружено, что кипячение реакционной смеси сверх определенного времени приводит к увеличению содержания в смеси 2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидропиразин-1,4-диоксида. Использование уксусной кислоты в количестве меньше эквимольного приводит к увеличению времени реакции и также к загрязнению конечного продукта 2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидропиразин-1,4-диоксидом.

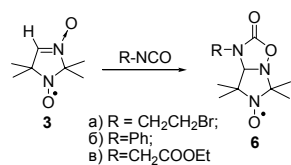
2.1. Нуклеофильное замещение атома брома в 1-(2-бромэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-оне

С целью расширения диапазона практически полезных свойств pH-чувствительного зонда (pK_a , липофильность, наличие тех или иных функциональных групп и т. д.) были предприняты попытки модификации заместителя в алкильной группе при экзо-циклическом атоме азота амидиновой группы, в частности, путем нуклеофильного замещения атома хлора в 4-(2-хлорэтил)амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксиде **4**. Попытки оказались безуспешными – во всех случаях был получен бициклический амидин 2,3,4,5,6,7-гексагидро-6-оксил-5,5,7,7-тетраметил-7H-имидазо[1,5-a]имидазол **5** – продукт внутримолекулярного алкилирования хлорэтильным фрагментом по эндо-циклическому атому азота амидиновой группировки.^a



Nu=K-фталимид; NaOAc; NaN₃; NaI

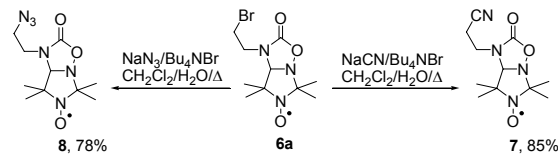
Нами предложен синтетический подход, который дает возможность избежать нежелательной реакции внутримолекулярного алкилирования. Ключевой стадией в нашем подходе является замещение бромидов в циклоаддукте 1-(2-бромэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-оне **6**. В данном случае оксикарбонильный фрагмент оксадиазолонового гетероцикла играет роль «защитной группы» для амидиновой функции.



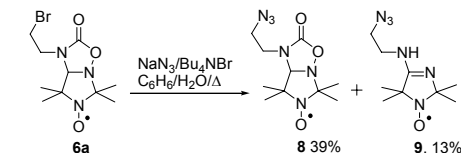
a) R = CH₂CH₂Br;
b) R = Ph;
в) R = CH₂COOEt

Нами показано, что в условиях межфазного катализа (CH₂Cl₂/H₂O/Vu₄NBr, кипячение) взаимодействие **6a** с NaCN происходит с сохранением оксадиазолонового цикла и приводит к продукту нуклеофильного замещения атома брома цианид-ионом – 1-(2-

цианоэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-ону **7** с выходом 85%. В этих же условиях реакция с NaN₃ приводит к замещению бромидов на азид с образованием 1-(2-азидоэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-b][1,2,4]оксадиазол-2-она **8** с выходом 78%.



Нами обнаружено, что состав реакционной смеси в реакции замещения бромидов нуклеофилами варьируется в зависимости от условий ее проведения. Например, замена CH₂Cl₂ на более высококипящий бензол в условиях межфазного катализа (C₆H₆/H₂O/Vu₄NBr, кипячение) приводит к образованию смеси циклоаддукта **8** и амидина **9** в молярном соотношении приблизительно 3:1.



Проведение реакций нуклеофильного замещения в диполярных апротонных растворителях, таких как ДМФА или ДМСО (безводный или содержащий до 10% H₂O) при T=110 °C приводит исключительно к продуктам, которые являются одновременно результатом расщепления оксадиазолонового цикла и нуклеофильного замещения бромидов – амидинам **9** или **10**.

Во всех описанных выше реакциях использовался двукратный избыток нуклеофила. Продукт **5**, образующийся в результате внутримолекулярного алкилирования, в реакционных смесях обнаружен не был. Это наблюдение свидетельствует о том, что в исследуемом ряду соединений скорость нуклеофильного замещения бромидов выше скорости расщепления оксадиазолонового гетероцикла.

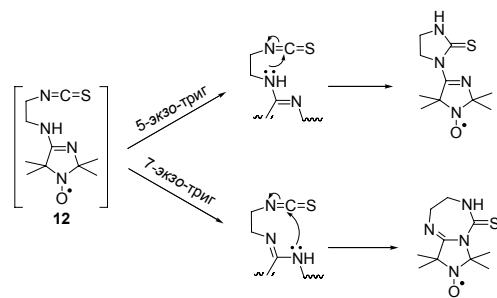
Доступность амидинов **9** или **10** и наличие в их составе функциональных групп, способных взаимодействовать с различного рода химическими реагентами, открывает широкие возможности для дальнейшей структурной модификации этих соединений. Одним из наиболее эффективных способов модификации азидо-группы является реакция Штаудингера, которая, как известно, протекает в мягких условиях, практически количественно и без образования побочных продуктов.

Так, при добавлении к азидопроизводному **9** под аргоном раствора P(*n*-Bu)₃ в эфире или ТГФ наблюдалось легкое выделение азота. Реакция завершилась приблизительно через 40 минут (определено методом ТСХ). Кроме P(*n*-Bu)₃, в реакции могут быть использованы другие фосфины, такие как PPh₃ и PEt₃,

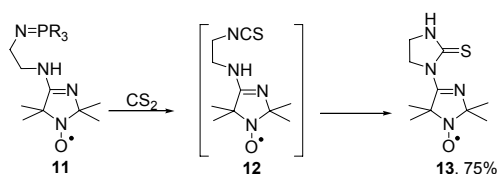
^a Литературные данные

однако в случае PPh_3 необходимо кипячение в ТГФ. Выделение иминофосфорана **11** не производилось, ввиду его чрезвычайно высокой реакционной способности.

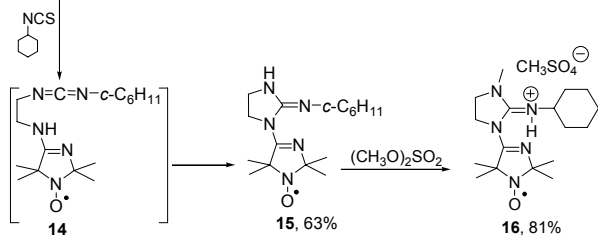
Последующая реакция иминофосфорана **11** с CS_2 приводит к образованию кристаллического продукта с элементным анализом, соответствующим изотиоцианатному производному **12**. Однако, в ИК-спектре синтезированного соединения отсутствовала характеристичная полоса валентных колебаний группы $-N=C=S$ в области $\nu=2040-2220\text{ см}^{-1}$. Основываясь на хорошо известной реакционной способности изотиоцианатов по отношению к азотсодержащим нуклеофилам, мы предположили, что полученный нами продукт является следствием внутримолекулярной циклизации изотиоцианатной группы по *экзо*- или *эндо*-циклическому атому азота амидиновой группы.



варианты циклизации (Схема 2).



a) R=Ph;
б) R=*n*-Bu;
в) R=Et



ИК-спектре полученного соединения отсутствует полоса поглощения в области $\nu=2130\text{ см}^{-1}$, характеристичной для поглощения $-N=C=N-$ группы.

Анализ возможных путей циклизации полученного изотиоцианатного производного с использованием правил Болдуина показал, что возможны как *5-экзо-триг* (атака по *экзо*-циклическому атому азота), так и *7-экзо-триг* (атака по *эндо*-циклическому атому азота)

Схема 2

Аналогично протекает реакция иминофосфоранов **11а,б** с циклогексилизотиоцианатом. Желтое кристаллическое соединение, образующееся в результате реакции, имеет элементный анализ, соответствующий карбодимидному производному **14**. В

На рис. 1 и 2 изображено ORTEP-представление структуры соединений **13** и **16** соответственно, что доказывает.

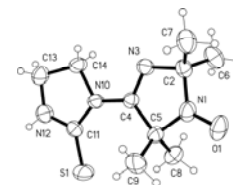


Рис.1

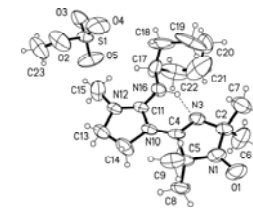
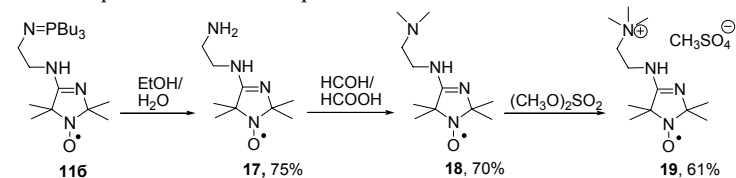


Рис. 2

Гуанидиновые производные нитроксильных радикалов ранее в литературе описаны не были. Исключительная способность гуанидиновой группы к связыванию делает ее одним из наиболее распространенных связывающих фрагментов в природе; с точки зрения молекулярного распознавания нитроксильные радикалы – производные гуанидина **15** и **16** могут представлять интерес в качестве синтетических рецепторов в исследованиях протеинов и нуклеиновых кислот методом ЭПР.

Иминофосфоран **116** легко гидролизуется под действием водного раствора этанола с образованием аминопроизводного **17**.



Алкилирование амина **17** в условиях реакции Эшвайлера-Кларка приводит с высоким выходом к диметиламинопроизводному **18**. Пониженная реакционная способность амидиновой группы в соединении **18** по отношению к алкилирующим реагентам позволяет селективно алкилировать третичную аминогруппу $(CH_3)_2SO_4$ с образованием четвертичной аммониевой соли **19**. Аминопроизводное **17**, может представлять интерес в качестве парамагнитного лиганда для координационной химии.

2.1.1. Спектры ЭПР синтезированных нитроксильных радикалов

Нами была изучена зависимость спектров ЭПР синтезированных в данной работе нитроксильных радикалов от pH среды. Обнаружено, что ЭПР-спектры всех соединений демонстрируют обратимую pH-зависимость. На рис. 3 показаны ЭПР-спектры аминопроизводного **17**, записанные в водном буфере в диапазоне pH от 1.52 до 6.37. Подобные двухкомпонентные спектры ЭПР, свидетельствующие о медленном химическом обмене $R^{\cdot} + H^+ \rightleftharpoons R^{\cdot}H^+$ в шкале времени ЭПР, наблюдались для всех нитроксильных радикалов изученных в данной работе.

На рис. 4 показано изменение a_N нитроксильного радикала **17** в зависимости

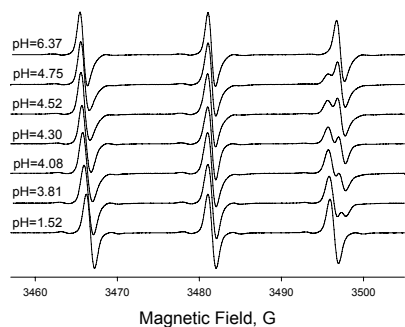


Рис. 3

от pH среды. Изотропная константа СТВ (a_N) была измерена как расстояние между низкополевой и центральной компонентами спектра ЭПР.

Магнитные параметры ($a_N R^+H$, $a_N R^*$ и Δa_N) спектров ЭПР имидазолиновых радикалов, синтезированных в этой работе, и соответствующие величины их pK_a приведены в таблице 1.

Таблица 1. Магнитные параметры синтезированных нитроксильных радикалов.

№	a_N , Гс		Δa_N , Гс	pK_a
	R^+H	R^*		
9	14.85 ± 0.01	15.74 ± 0.01	0.89 ± 0.014	5.47 ± 0.02
10	14.87 ± 0.03	15.73 ± 0.02	0.86 ± 0.036	5.06 ± 0.02
13	14.81 ± 0.05	15.53 ± 0.03	0.72 ± 0.058	2.82 ± 0.05
15	15.45 ± 0.01	15.60 ± 0.01	0.15 ± 0.014	10.2 ± 0.1
16	15.44 ± 0.06	15.61 ± 0.05	0.17 ± 0.078	12.5 ± 0.1
17	14.80 ± 0.01	15.61 ± 0.02	0.81 ± 0.022	4.11 ± 0.02
18	14.83 ± 0.01	15.70 ± 0.02	0.87 ± 0.022	3.73 ± 0.02
19	14.69 ± 0.01	15.63 ± 0.02	0.94 ± 0.022	3.80 ± 0.02

2.2. Термолитическое и нуклеофильное раскрытие оксадиазолонового гетероцикла в 1-*R*-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-*b*][1,2,4]оксадиазол-2-онах

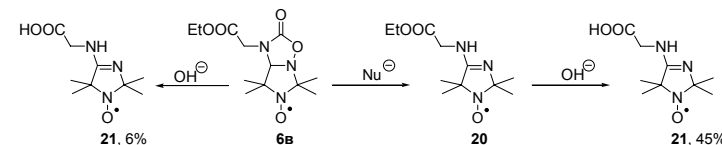
Как показывает анализ литературных данных, раскрытие оксадиазолонового цикла может протекать как термически, так и в результате атаки нуклеофила на атом углерода карбонильной группы.

С целью поиска эффективного метода препаративного синтеза *N'*-замещенных амидинов мы изучили реакцию раскрытия оксадиазолонового цикла в 1-*R*-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-*b*][1,2,4]оксадиазол-2-онах **6** ($R = \text{Ph}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}, \text{CH}_2\text{COOEt}$) под действием нуклеофилов и в условиях термолитиза.

Как оказалось, в ряде случаев термолитиз циклоаддуктов **6** ($R = \text{Ph}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$) в ДМФА и ДМСО приводит к амидинам с хорошим выходом. Было обнаружено, что присутствие воды в ДМФА не влияет на результат реакции – продолжительность и выход продукта термолитиза близки к наблюдаемым в сухом ДМФА. Очевидно, нуклеофильность воды слишком низка для того, чтобы влиять на эту реакцию заметным образом. Однако, термолитическое расщепление оксадиазолонового гетероцикла возможно далеко не во всех случаях. Это зависит от химической природы заместителя при экзоциклическом атоме азота – в частности, от того, может ли заместитель претерпевать дальнейшие превращения в условиях термолитиза. Например, термолитиз циклоаддукта **6a** в ДМФА при 110°C привел к сложной смеси продуктов, которые могут являться результатом внутри/межмолекулярного алкилирования амидиновой группы и/или элиминирования НВг.

Гораздо более результативным оказалось раскрытие оксадиазолонового гетероцикла под действием нуклеофилов. Как было отмечено выше, использование 2-х эквивалентов нуклеофила позволяет осуществить и нуклеофильное замещение галогена, и раскрытие цикла. Опираясь на эти наблюдения, был разработан мягкий способ раскрытия оксадиазолонового цикла слабоосновными нуклеофилами (NaCN , NaN_3), не затрагивающий группы, чувствительные к щелочному гидролизу, такие, например как сложноэфирная и цианогруппы. Этот метод открывает новые возможности в синтезе нитроксильных радикалов с pH-зависимым спектром ЭПР.

Следующий пример демонстрирует синтетическую ценность разработанного нами метода расщепления циклоаддуктов. Попытка синтезировать амидинокислоту **21** в условиях традиционного щелочного гидролиза циклоаддукта **6b** приводит к сложной смеси продуктов; амидинокислота **21** была получена с ничтожным выходом в 6%. Расщепление оксадиазолонового цикла в соединении **6b** в мягких нуклеофильных условиях (NaN_3 , ДМСО, 55 °C) и последующий щелочной гидролиз сложного эфира **20** с хорошим выходом (45%) приводит к амидинокислоте **21**, обладающей pH-зависимым спектром ЭПР.



Учитывая, что раскрытие оксадиазолонового гетероцикла является одним из основных способов получения *N'*-замещенных амидинов, более глубокое понимание закономерностей протекания этой реакции представляется важной задачей. Поэтому мы более детально изучили качественное влияние природы

нуклеофила, растворителя (водные/безводные условия), и соотношения нуклеофила и субстрата на выход амидина и время протекания реакции.

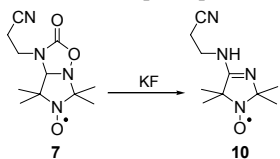
В качестве субстрата мы использовали циклоаддукт **6в**. В качестве нуклеофильных реагентов использовались NaN_3 , NaCN , KF , KBr , KCl , и NaNO_2 . Расщепление оксадиазолонового цикла в соединении **6в** проводили в растворе ДМСО при 55 °С либо в безводных условиях, либо с добавлением 5% (объемных) H_2O . В таблице 2 суммированы результаты экспериментов по раскрытию оксадиазолонового гетероцикла перечисленными выше реагентами в водных и безводных условиях. Нуклеофильные реагенты приведены в порядке увеличения времени реакции в безводных условиях (ДМСО). Наиболее активным в данной серии реагентов является фторид-ион. Выявленный ряд реакционной способности нуклеофилов ($\text{F}^- > \text{CN}^- > \text{N}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$) в ДМСО качественно коррелирует с рядом основностей соответствующих нуклеофилов в этом растворителе.

Таблица 2. Расщепление циклоаддукта **6в** нуклеофильными реагентами.

Нуклеофил	F^-	CN^-	N_3^-	NO_2^-	Cl^-	Br^-
Время реакции, ДМСО, ч	4	12	14	21.5	310	362
Выход,* ДМСО, %	74	82	74	62	59	52
pK_a сопр. кислоты (в ДМСО)	15	12.9	7.9	7.5	1.8	0.9
Выход,* ДМСО + 5 об. % H_2O , %	12	10	10	10	12	14
Время реакции, ДМСО + 5 об. % H_2O , ч	369	171	753	800	486	383

*Приведен препаративный выход.

Таким образом, наиболее удобными для препаративного использования условиями нуклеофильного раскрытия оксадиазолонового цикла (исходя из соотношения время реакции/выход) являются безводный KF в сухом ДМСО.



Приведенный ниже пример демонстрирует эффективность и синтетическую ценность найденных нами условий раскрытия оксадиазолонового цикла. Так, обработка циклоаддукта **7**, содержащего циано-группу, KF в ДМСО при 55 °С с хорошим выходом (46%)

приводит к амидину **10**. В данном случае выход продукта реакция не отличается от выхода при использовании KCN , однако время реакции уменьшается в 8 раз.

Возможно несколько путей трансформации оксадиазолонового гетероцикла в результате реакции с нуклеофильными реагентами (Схема 3). Путь А основан на гетеролитическом разрыве связи C-N оксадиазолонового фрагмента, и подразумевает возврат нуклеофила в реакцию (Схема 3, Путь А). Путь Б, подразумевающий гетеролитический разрыв связи C-O и использование двух эквивалентов нуклеофильного реагента, также представляется возможным (Схема 3, Путь Б). Эта последовательность превращений могла бы

реализоваться, в частности, в условиях раскрытия оксадиазолонового гетероцикла избытком метилата натрия. В этом случае одним из продуктов реакции должен быть устойчивый диметилкарбонат, который может быть зарегистрирован в реакционной смеси спектральными методами.

Мы исследовали сольволиз циклоаддукта **6б** раствором CH_3ONa в CH_3OH методом хромато-масс спектрометрического анализа на начальной и конечной стадиях реакции. Присутствие диметилкарбоната в реакционной смеси обнаружено не было. Вместо этого, наблюдалось увеличение количества CO_2 в реакционной смеси с течением времени (точной количественной оценки не проводилось), что свидетельствует в пользу пути А.

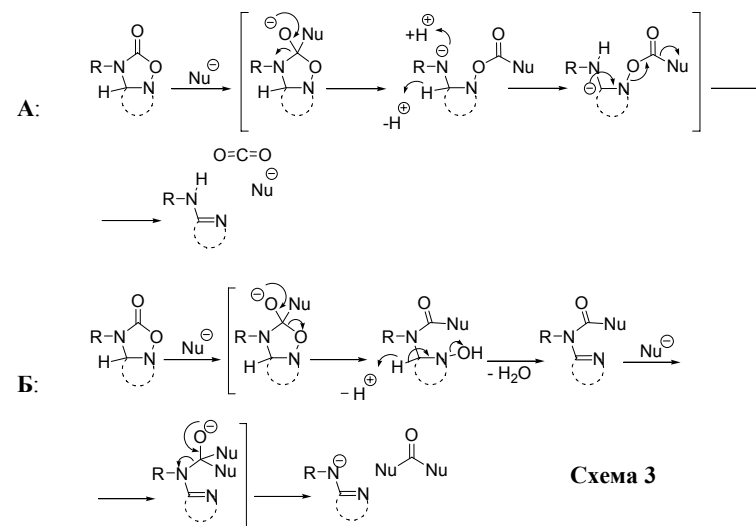


Схема 3

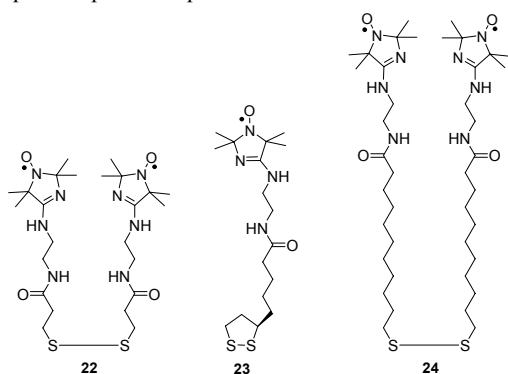
Было обнаружено, что препаративное раскрытие оксадиазолонового цикла может быть осуществлено и количеством нуклеофила меньшим, чем эквимольное. Использование количества эквивалентов нуклеофила меньше эквимольного приводит лишь к увеличению времени реакции. Эти результаты находятся в полном соответствии с предложенной схемой нуклеофильного раскрытия оксадиазолонового цикла, которые подразумевают возврат нуклеофила в реакцию.

2.3. Нитроксильные радикалы-дисульфиды с pH-зависимым спектром ЭПР и их использование для исследования свойств золотых наночастиц

Свойства покрывающего наночастицы лигандного монослоя и диффузного слоя, образующегося на границе раздела фаз, а также ближайшего окружения наночастиц, могут быть изучены, в частности, при помощи молекул-репортеров (молекулярных зондов). Преимущество молекулярных зондов перед другими методами заключается в том, что они позволяют получать спектральную информацию непосредственно из места их расположения. В сочетании с аналитическими методами, которые предоставляют информацию о состоянии

ионизации зонда, этот подход позволил бы непосредственно следить за кислотно-основным равновесием на различных участках лигандного слоя наночастицы, в том числе и на гетерогенной границе раздела фаз. Нитроксильные радикалы в сочетании со спектроскопией ЭПР предоставляют такую возможность.

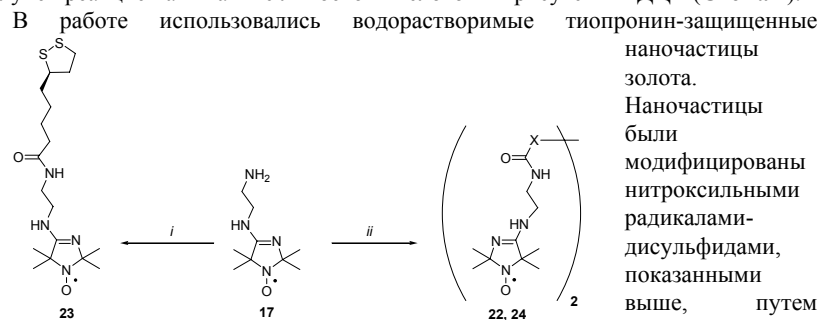
Как известно, реакция стабилизированных тиолами наночастиц золота с дисульфидами является одним из способов модификации состава лигандного монослоя. Нами синтезированы нитроксильные радикалы-дисульфиды, обладающие pH-зависимым спектром ЭПР, и получены первые результаты, демонстрирующие их пригодность в качестве лигандов для исследования свойств органического монослоя, защищающего наночастицы золота, и явлений на границе раздела органического монослоя и водной фазы.



В структуре синтезированных нами спин-меченых лигандов объединены дисульфидный фрагмент, ответственный за присоединение к поверхности нанокластера Au, и имидазолиновый нитроксильный радикал, являющийся pH-репортером. Эти фрагменты соединены линкерами различной длины, что позволило исследовать свойства лигандного

монослоя на различном расстоянии от металлической поверхности наночастицы.

Спин-меченые лиганды-дисульфиды **22** и **24** синтезированы реакцией амина **17** с дитиопропионовой и дитиоундекановой кислотами, соответственно, в присутствии EEDQ в качестве конденсирующего реагента. Дисульфид **23** получен реакцией амина **17** с липовой кислотой в присутствии ДЦК (Схема 4).



22: X = CH₂-CH₂-S-
24: X = (CH₂)₁₀-S-

были получены спин-меченые pH-чувствительными нитроксильными

радикалами наночастицы золота, имеющие pH-зависимый спектр ЭПР (Рис. 5). Значения pK_a спин-меченых наночастиц золота сдвинуты в область более основных значений pK_a по сравнению с pK_a свободного лиганда. Наибольшая разница в pK_a ($\Delta pK_a \approx 1.14$) наблюдалась для лиганда **23**.



Рис. 5

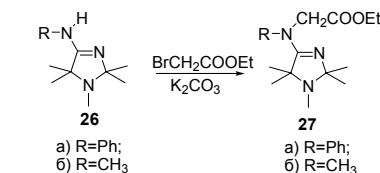
3.1. Синтез N',N'-дизамещенных 4-амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксидов через алкилирование диамагнитных 4-R-амино-1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолинов

Введение дополнительного заместителя, несущего функциональную группу, к экзо-циклическому атому азота амидиновой группировки, являющейся частью гетероциклической системы нитроксильных радикалов ряда 3-имидазолина, может рассматриваться в качестве одного из подходов к синтезу функционально-замещенных нитроксильных радикалов с pH-зависимым спектром ЭПР.

Было обнаружено, что амидины – нитроксильные радикалы **25** инертны в реакции алкилирования. В частности, алкилирование амидина **25** (R=Ph) такими реагентами как CH₂=CH-CN, BrCH₂COOEt, CH₃I и (CH₃)₂SO₂, а также BrCH₂COOEt в присутствии NaNH не привело к каким-либо продуктам реакции, во всех случаях было выделено исходное соединение. По-видимому, причиной низкой реакционной способности амидиновой группы соединения **25** (R=Ph) в реакции алкилирования является сильное электроакцепторное влияние нитроксильной группы.

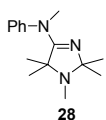
В начале 90х годов был предложен подход к синтезу N',N'- и N,N'-дизамещенных производных амидина, основанный на алкилировании диамагнитного предшественника нитроксильного радикала и последующем его окислении. Однако, этот подход был проиллюстрирован введением в молекулу амидина – нитроксильного радикала лишь незамещенной метильной группы.

Мы использовали этот подход в нашей работе для введения в молекулу амидина - нитроксильного радикала заместителей, содержащих функциональные группы. В качестве алкилирующего реагента был выбран BrCH₂COOEt. Региохимия алкилирования и соответственно строение соединения **27a** были установлены на основании сравнения спектра ЯМР ¹³C и УФ-спектра синтезированного соединения со спектрами описанных ранее амидинов **28** и **29**, содержащих метильную группу как у экзоциклического, так и у эндоциклического атомов азота амидиновой группировки. В качестве критерия для оценки положения алкилирования использовали величину химического сдвига *ipso*-атома углерода фенильной группы. Это позволило нам приписать синтезированному соединению структуру продукта экзоциклического

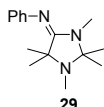


соединения **27a** были установлены на основании сравнения спектра ЯМР ¹³C и УФ-спектра синтезированного соединения со спектрами описанных ранее амидинов **28** и **29**, содержащих метильную группу как у экзоциклического, так и у эндоциклического атомов азота амидиновой группировки. В качестве критерия для оценки положения алкилирования использовали величину химического сдвига *ipso*-атома углерода фенильной группы. Это позволило нам приписать синтезированному соединению структуру продукта экзоциклического

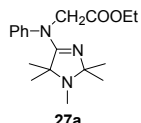
алкилирования – этилового эфира *N*-(1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-4-ил)-



УФ(в этаноле): λ_{\max} = 246 нм
 ϵ = 4400
 ЯМР ^{13}C ($\text{C}_7\text{-Ph}$ в CDCl_3):
 145.72 м. д.



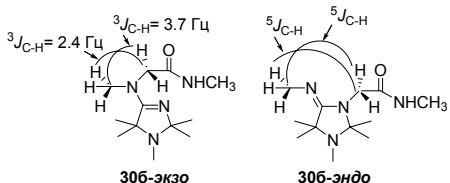
УФ(в этаноле): λ_{\max} = 238 нм
 ϵ = 12200
 ЯМР ^{13}C ($\text{C}_7\text{-Ph}$ в CDCl_3):
 150.31 м. д.



УФ(в этаноле): λ_{\max} = 247 нм
 ϵ = 4800
 ЯМР ^{13}C ($\text{C}_7\text{-Ph}$ в CDCl_3):
 139.93 м. д.

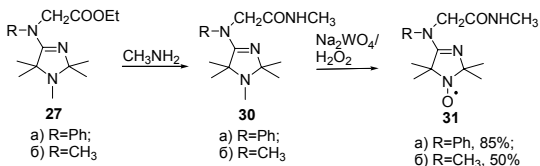
N-фениламиноуксусной кислоты **27a**.

Соединение **276** было превращено в метиламид *N*-(1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-4-ил)-*N*-метиламиноуксусной кислоты **306**, на котором было проведено установление положения алкилирования методом спектроскопии ЯМР. В спектре ЯМР ^{13}C амида **306**, записанном в режиме монорезонанса в дейтероацетоне, было обнаружено, что сигнал группы *N*- CH_2 при 56.0 м.д. представляет собой триплет кватетов с константами спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C-H}}=90.2$ Гц, $^3J_{\text{C-H}}=2.4$ Гц, а сигнал *N*-метильной группы при 37.8 м.д. представляет собой кватет триплетов с константами спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C-H}}=109.6$ Гц и $^3J_{\text{C-H}}=3.7$ Гц (соответствующие константы $^3J_{\text{C-H}}$ показаны на Рис. 6).

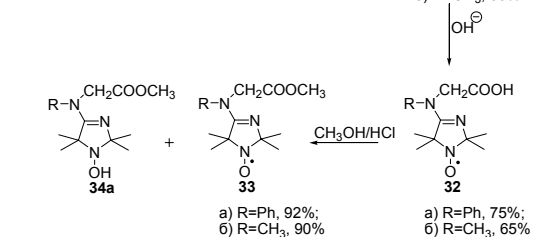


В случае алкилирования по эндоциклическому атому азота расщепление сигнала атома углерода экзо-метильной группы на протонах группы CH_2 наблюдаться не должно, на этом основании полученному соединению также было приписано строение продукта экзо-алкилирования.

При попытке перейти от *N*- CH_3 -производного 3-имидазолина к



соответствующим
 нитроксильным радикалам
 оказалось, что
 сложноэфирная, амидная
 и карбоксильная группы
 претерпевают деструкцию



в условиях реакции
 окисления. Замена
 первичной амидной
 группы на *N*-
 метиламидную и
 последующее окисление в
 системе $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{WO}_4$ с

хорошим выходом приводит к соответствующим нитроксильным радикалам **31**.

Гидролиз метиламидного производного приводит к кислоте **32**. Этерификация кислоты **31** в $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$ дает сложный эфир **33**. В случае **33a** в результате диспропорционирования нитроксильного радикала в кислой среде образуется и продуктом его восстановления **34a**, который может быть превращен обратно в радикал окислением. Для соединения **33a** был выполнен рентгеноструктурный анализ (рис. 6), данные которого подтверждают правильность сделанных нами ранее выводов относительно направления алкилирования. Все нитроксильные радикалы, синтезированные в этой работе, имеют рН-зависимый спектр ЭПР. Для ряда нитроксильных радикалов были определены коэффициенты распределения (K_p) в системе октанол/вода, являющиеся мерой липофильности спинового зонда. Для синтезированных нами соединений K_p меняется в довольно широких пределах (от 0.015 до 27.7), что делает их пригодными к использованию в различных средах, включая биологические системы, такие как кровь и клеточные мембраны.

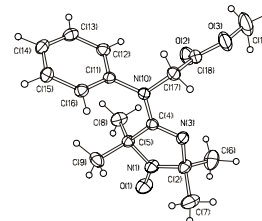


Рис. 6

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые методы синтеза функционально-замещенных амидинов – производных нитроксильных радикалов ряда 3-имидазолина. Изучено влияние рН среды на параметры спектров ЭПР синтезированных нитроксильных радикалов и показано, что все они обладают рН-зависимыми спектрами ЭПР.

2. Разработан простой, эффективный и легко воспроизводимый метод синтеза 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксида, основанный на кислотно-катализируемой конденсации 2-гидроксиамино-2-метилпропаналь оксима с диэтоксидом или диметоксипропаном.

3. Разработан новый подход к синтезу функциональных производных нитроксильных радикалов ряда 3-имидазолина, основанный на нуклеофильном замещении галогенида в экзо-*N*-галогеналкильном заместителе циклоаддукта 1-(2-бромэтил)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-*b*][1,2,4]оксадиазол-2-она. В этом подходе оксикарбонильный фрагмент оксадиазолонового гетероцикла использован в качестве “защитной группы” для амидинового фрагмента.

4. Обнаружена и изучена реакция раскрытия оксадиазолонового цикла в 1-(2-*R*)-6-оксил-5,5,7,7-тетраметилтетрагидроимидазо[1,5-*b*][1,2,4]оксадиазол-2-онах слабоосновными нуклеофилами, такими как KF , NaCN , NaN_3 , NaNO_2 , KCl и KBr . Показано, что реакционная способность нуклеофилов в ДМСО меняется в ряду $\text{F}^- > \text{CN}^- > \text{N}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$, который качественно коррелирует с рядом основности нуклеофилов в этом растворителе.

5. Разработаны методы синтеза и синтезированы нитроксильные радикалы-дисульфиды, обладающие рН-зависимыми спектрами ЭПР. Продемонстрирована их практическая ценность в качестве лигандов-репортеров для мечения наночастиц золота, исследования методом спектроскопии ЭПР

диэлектрических и электростатических свойств окружающего их лигандного монослоя, а также границы раздела органической и водной фаз.

6. Разработан новый синтетический подход к функциональным производным N',N'-дизамещенных амидинов – нитроксильных радикалов ряда 3-имидазолина, основанный на селективном алкилировании амидиновой группы диамагнитных 4-R-амино-1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолинов этиловым эфиром бромуксусной кислоты и последующем окислении продуктов алкилирования в соответствующие нитроксильные радикалы. Показано, что алкилирование амидиновой группы в диамагнитных 4-R-амино-1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолинах этиловым эфиром бромуксусной кислоты проходит региоселективно с образованием продуктов экзо-N-алкилирования.

Основные результаты исследований изложены в следующих работах:

1. Voinov M. A., Polienko J. F., Schanding T., Bobko A. A., Khramtsov V. V., Gatilov Yu. V., Rybalova T. V., Smirnov A. I., Grigor'ev I. A. Synthesis, Structure, and X-Band (9.5GHz) EPR Characterization of the New Series of pH-Sensitive Spin Probes: N,N-Disubstituted 4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-1-Oxyls. // *J. Org. Chem.* – 2005. – V. 70. – P. 9702-9711.

2. Polienko J. F., Schanding T., Voinov M. A., Grigor'ev I. A. Improved Synthesis of 1-Hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline 3-Oxide (HTIO). // *Synthetic Comm.* – 2006. – V. 36. – P. 2763–2768.

3. Polienko J. F., Schanding T., Gatilov Yu. V., Grigor'ev I. A., Voinov M. A. Studies toward the Synthesis of 4-(2-R-ethyl)amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-1-Oxyls. Nucleophilic Substitution of Bromide in the N-Alkyl Chain of the 1,2,4-Oxadiazol-2-one Precursor. // *J. Org. Chem.* – 2008. – V. 73. – P. 502-510.

4. Khlestkin V. K., Polienko J. F., Voinov M. A., Smirnov A. I., Chechik V. Interfacial Surface Properties of Thiol-Protected Gold Nanoparticles: A Molecular Probe EPR Approach. // *Langmuir.* – 2008. – V. 24. – P. 609-612.

5. Полиенко Ю. Ф., Григорьев И. А., Войнов М. А. Синтез N'-замещенных амидинов путем расщепления оксадиазолонового гетероцикла слабоосновными нуклеофилами. Влияние природы нуклеофила и молярного соотношения нуклеофила и субстрата. // *ХГС.* – 2009. – Т. 499, № 1. – С. 71-79.

Основные результаты диссертации доложены на отечественных и международных конференциях:

6. Polienko J. F., Voinov M. A., Grigor'ev I. A. Synthesis of Amidines of 3-Imidazoline Series and Novel pH-Sensitive Spin Probes Based on Them. // *The Third Youth School-Conference on Organic Synthesis "Organic Synthesis in the New Century" YSCOS-3: Abstracts of Papers.* – Saint-Petersburg, Russia, June 24-27, 2002, p. 153.

7. Polienko J. F. Alkylation of Amidines – the Derivatives of 3-Imidazoline as a New Method for the Synthesis of pH-Sensitive Spin Probes. // *XL International Scientific Student Conference "Student and Scientific and Technological Advance": Abstracts of Papers.* – Novosibirsk, Russia, April 15-18, 2002, p. 136.

8. Polienko J. F., Bobko A. A., Voinov M. A. Synthesis of novel pH-sensitive spin probes. // *Youth Scientific School-Conference on Organic Synthesis "Relevant*

Problems of Organic Chemistry". Novosibirsk, Russia, September 29-October 3, 2003, <http://www.nioch.nsc.ru/school/index.htm>.

9. Voinov M. A., Polienko J. F., Schanding T., Bobko A. A., Khramtsov V. V., Gatilov Y. V., Rybalova T. V., Smirnov A. I., Grigor'ev I. A. Exo-N,N-Disubstituted Amidines of Imidazoline Nitroxide Series: Synthesis and Characterization as pH Spin Probes. // *4th International Conference on Nitroxide Radicals: Synthesis, Properties and Implications of Nitroxides (SPIN-2005): Book of abstracts.* – Novosibirsk, Russia, September 20-24, 2005, p.42.

10. Schanding T., Polienko Y. F., Voinov M. A., Grigor'ev I. A. 4-R-Amino 3-Imidazoline 1-Oxyls: a Novel Approach to the Alkylamino Chain Modification. // *4th International Conference on Nitroxide Radicals: Synthesis, Properties and Implications of Nitroxides (SPIN-2005): Book of abstracts.* – Novosibirsk, Russia, September 20-24, 2005, p.88.

11. Voinov M. A., Polienko J. F., Schanding T., Bobko A. A., Khramtsov V. V., Gatilov Y. V., Rybalova T. V., Smirnov A. I., Grigor'ev I. A. Novel nitroxide spin probes for local pH mapping: synthesis and X-band EPR characterization. // *XXXIV Southeastern magnetic resonance conference, November 11-13, 2005, Atlanta, Georgia, USA, p. 53.*

12. Woldman Y. Yu., Bobko A. A., Polienko J. F., Voinov M. A., Khramtsov V. V. Development of Stable Functional EPR Probes by Encapsulation of pH and NO-Sensitive Nitroxides in Liposomes. // *A Joint Conference of the 12th In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging and the 9th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling: Book of abstracts.* – Chicago, Illinois, April 29 – May 3, 2007.

13. Полиенко Ю. Ф., Schanding T., Войнов М. А., Григорьев И. А. 4-(2-R-Этил)-амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксилы: модификация экзо-N-алкильного фрагмента. // *Всероссийская научная конференция «Современные проблемы органической химии», посвященная 100-летию со дня рождения академика Н.Н. Ворожцова: Сборник тезисов.* – Новосибирск, 5-9 июня 2007.

14. Chechik V., Khlestkin V. K., Polienko J. F., Voinov M. A., Smirnov A. I. Interfacial Electrostatics of Monolayer-Protected Gold Clusters by Molecular Probes. // *International Conference "Particles 2008. Particle Synthesis, Characterization, and Particle-Based Advanced Materials": Abstracts of Papers.* – Orlando, Florida, USA, May 10-13, 2008, p. 128.

Формат бумаги 60x84 1/16. Объем печати 1 печ. лист.
Тираж 100 экз.

Отпечатано на ротапринтере Новосибирского института органической химии
им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
6300906 Новосибирск 90, пр. ак. Лаврентьева 9