

УДК 547.793.2+547.26'118

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭПР ГЕНЕРАЦИИ NO
В РЕАКЦИИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
ДИХЛОРДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА
ТРИФЕНИЛФОСФИНОМ**

И.В. Галкина, Е.В. Тудрий, С.Б. Орлинский, М.С. Тагиров, В.И. Галкин

Аннотация

Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) установлено образование NO в реакции фосфорилирования дихлординитробензофураксана трифенилфосфином. Подтверждено необычное течение реакции с участием бензофураксановых нитрогрупп в качестве реакционных центров. Предложен механизм реакции, по которому образуется дифенолятный дифосфатаин и хлористый нитрозил, последний в процессе реакции распадается на оксид азота и молекулярный хлор.

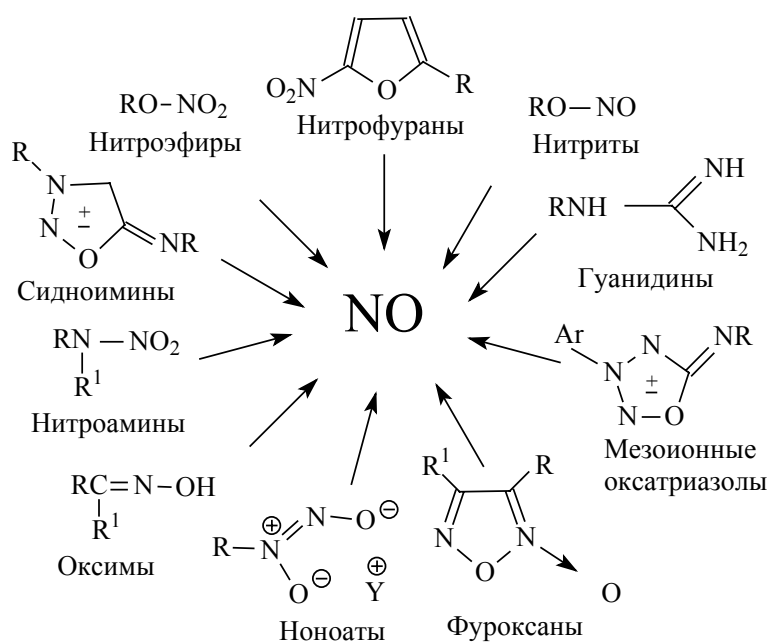
Ключевые слова: трифенилфосфин, дихлординитробензофураксан, фосфорилирование, оксид азота, ЭПР-спектроскопия, гетероциклические соединения.

Введение

За последние 20 лет в биохимии произошли изменения ряда основных представлений о функционировании различных биологических систем. В частности, было обнаружено, что такое низкомолекулярное соединение, как оксид азота NO, является одним из универсальных и необходимых регуляторов функций метаболизма, а также уникальной сигнальной молекулой, посредством которой клетки могут обмениваться информацией. Оксид азота участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов, ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках сосудов, функционирует в центральной и вегетативной нервной системе, регулируя деятельность органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы.

Широта биологической активности NO достаточно велика. В 1992 г. в журнале "Science" NO была названа молекулой года, а в 1998 г. трое американских фармакологов Ф. Мюрад (F. Murad), Л. Игнаро (L.J. Ignarro) и Р. Фаршготт (R. Furchgott) были удостоены Нобелевской премии в области медицины за выяснение роли NO в функционировании кровеносной системы. Количество обзорных и оригинальных публикаций, посвященных проблеме NO, ежегодно возрастает лавинообразно.

На сегодняшний день в здравоохранении используется целый ряд лекарственных средств, активность которых обоснованно связывают с их способностью высвобождать оксид азота:



Одним из интереснейших классов гетероциклических соединений являются нитрозамещенные бензофуроксаны [1–3], которые проявляют широкий спектр биологической активности, являясь донорами NO [4–7], и рассматриваются как пролекарства, реализующие свою биологическую активность через группу посредников внутри клетки.

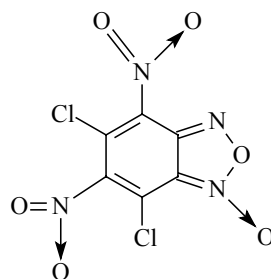


Рис. 1. 5,7-Дихлор-4,6-динитробензофуроксан

Для исследования процесса фосфорилирования методом ЭПР был выбран 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксан, представленный на рис. 1.

Высвобождение оксида азота в этих соединениях может происходить как за счет скрытых нитрогрупп пятичленного фуроксанового кольца, так и благодаря нитрогруппам бензольного кольца (рис. 1). Таким образом, синтез новых молекул – генераторов оксида азота – является новым, перспективным и целесообразным направлением создания эффективных лекарственных средств.

Результаты и обсуждение

5,7-Дихлор-4,6-динитробензофуроксан (рис. 1) представляет собой достаточно уникальную и весьма реакционноспособную систему с электрофильным

бензофуроксановым циклом, склонным к реакциям нуклеофильного замещения в силу одновременного присутствия мощных электроноакцепторных заместителей и легко уходящих групп.

Целью настоящего исследования является изучение методом ЭПР открытой ранее необычной реакции фосфорилирования дихлординитробензофуоксана трифенилфосфином [8], которая не останавливается на стадии образования дифосфониевой соли (2), а протекает дальше с элиминированием предположительно двух молекул оксида азота, молекулы хлора и образованием в конечном итоге устойчивого дифосфорилированного продукта **3**, строение которого можно описать мезомерными формами (**3a–c**) от дифенолятного дифосфата бетаина **3a** до дикетодионида **3c** (схема 1).

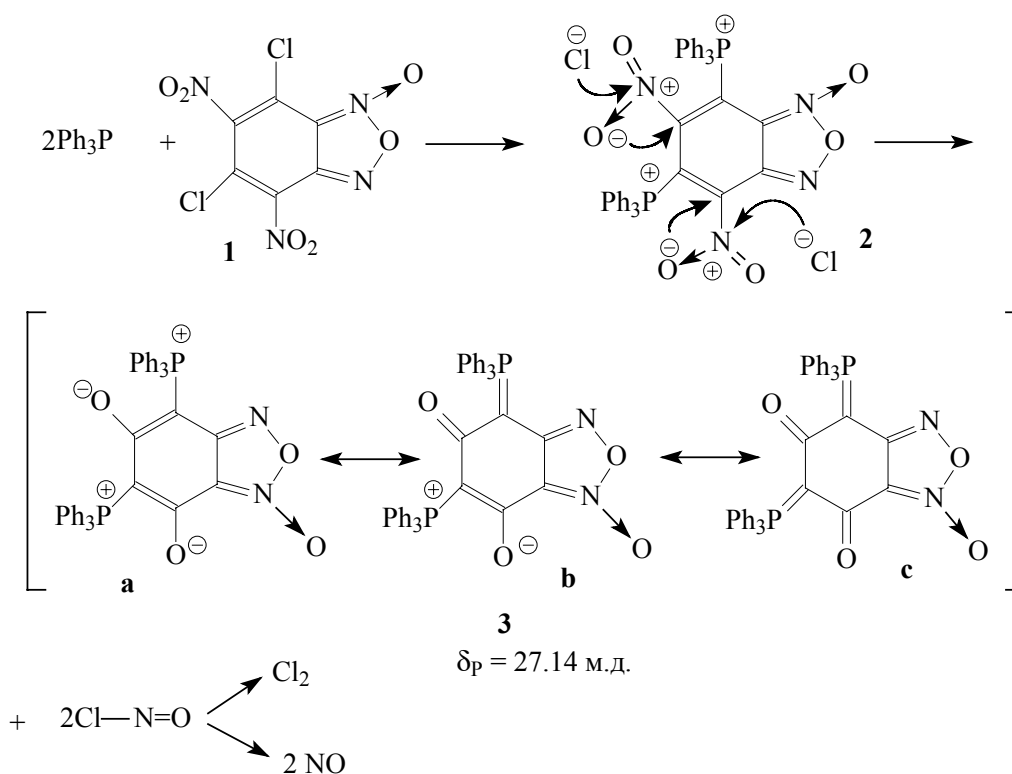


Схема 1

Строение полученного продукта **3** было доказано методом рентгеноструктурного анализа (рис. 2) [8, 9].

Изученная реакция протекает легко с характерным интенсивным изменением окраски. Реакционная смесь окрашивается от ярко-желтого через красный в темно-вишневый цвет, после чего с течением времени наблюдается выпадение кристаллов белого цвета с $T_{\text{разл.}} 235 \text{ }^\circ\text{C}$. Выход конечного продукта **3** после выделения и очистки составляет около 75%. В ЯМР ^{31}P спектрах продукта **3** фиксируется в характерной для фосфониевых соединений области единственный сигнал с $\delta_P 27.14 \text{ м.д.}$ двух эквивалентных ядер атома фосфора.

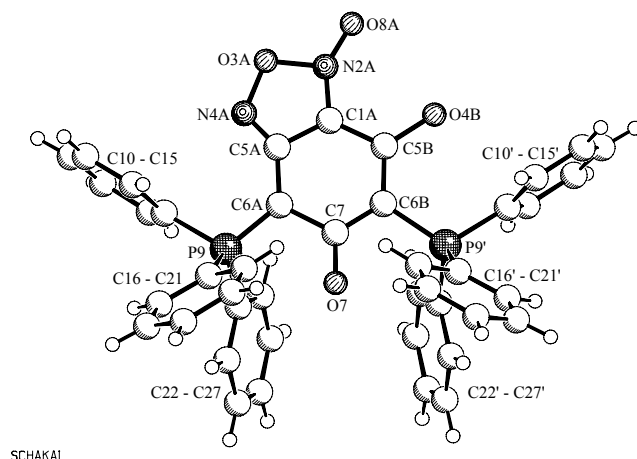


Рис. 2. Молекулярная структура продукта 3

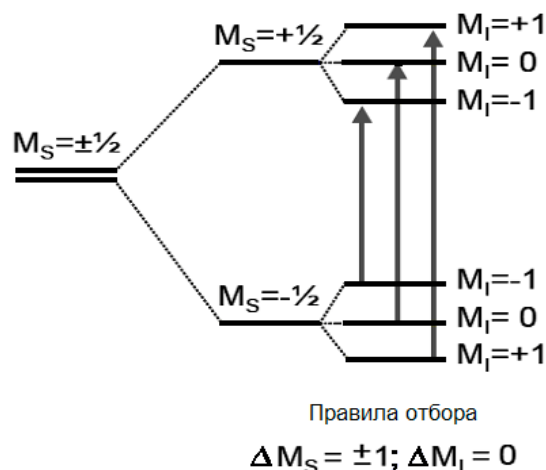


Рис. 3. Схема расщепления уровней нитроксильного радикала

По нашему предположению образующийся в результате данной реакции оксид азота является стабильным, короткоживущим свободным радикалом – парамагнетиком, который легко подвергается самым разнообразным химическим трансформациям.

Фиксация образования оксида азота в данной реакции методом ЭПР с целью подтверждения либо опровержения предложенного ранее механизма реакции (схема 1) и составляла основную задачу настоящего исследования.

Экспериментальный спектр ЭПР в первом приближении можно описать взаимодействием одного неспаренного электрона со спином $S = 1/2$ с ядром азота ^{14}N со спином $I = 1$. Положение линии ЭПР определяется g -фактором, близким к 2, и константой сверхтонкого взаимодействия A около 14 Гс. На рис. 3 приведена схема расщепления уровней энергии нитроксильного радикала и показаны три перехода.

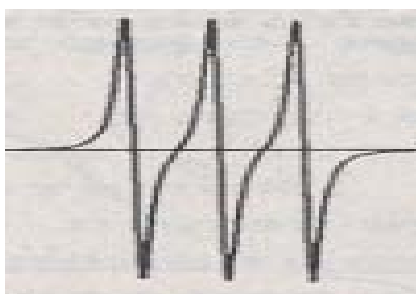


Рис. 4. ЭПР-спектр нитроксильного радикала

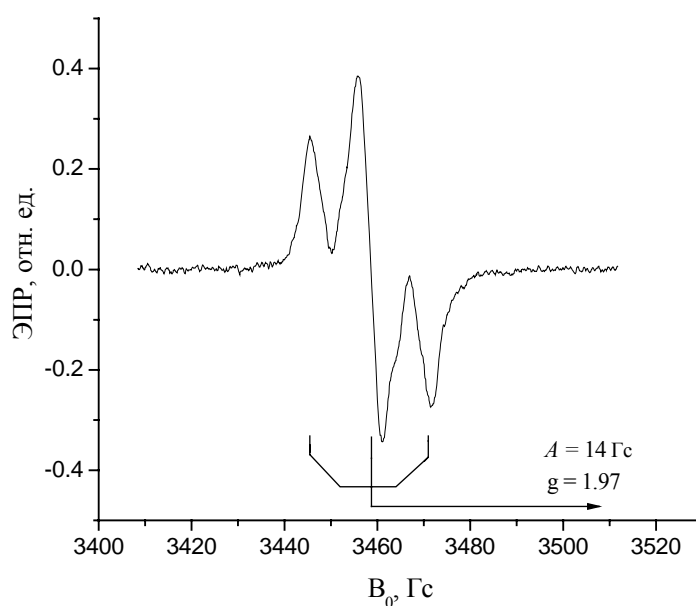


Рис. 5. ЭПР-спектр реакционной смеси через 28 ч после начала реакции

Соответственно, и спектр ЭПР нитроксильного радикала по этим причинам состоит из трех линий, что и представлено на рис. 4.

NO входит в состав нитроксильных радикалов, нашедших широкое применение в качестве спиновых меток и парамагнитных зондов для исследования молекулярной динамики и структуры жидкостей, полимеров и биологических систем. Они плодотворно и широко используются для изучения механизмов химических реакций и ингибирования радикальных процессов. Кроме того, нитроксильные радикалы являются удобными системами для проверки применимости различных приближений квантовомеханических расчётов молекулярных систем.

Анализ ЭПР-спектров заключается в определении константы сверхтонкого расщепления и g -фактора. Спектр ЭПР реакционной смеси и его параметры представлены на рис. 5.

Спектры, записанные при различной продолжительности реакции, приведены на рис. 6. Из него видно, что уже через 5 мин после начала реакции в спектре

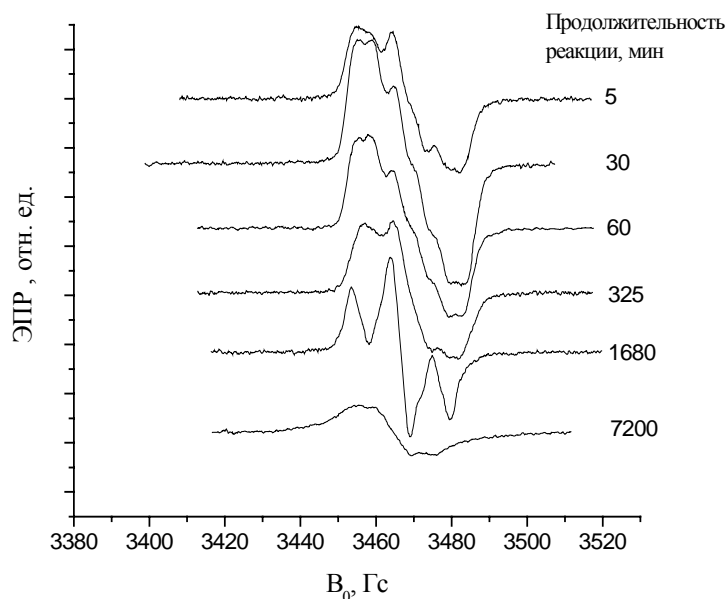


Рис. 6. ЭПР-спектры реакционной смеси при различной продолжительности реакции

ЭПР появляется сигнал, характерный для нитроксильного радикала. С течением времени изменяется форма спектра и интенсивность сигнала, и через 5 сут после начала реакции присутствие NO не фиксируется явно, так как форма ЭПР спектра NO зависит от подвижности комплекса.

Особый интерес представляют спектры, снятые при 30- и 60-минутной продолжительности реакции. На них видна неразрешённая сверхтонкая структура, вызванная взаимодействием неспаренного электрона с неизвестным пока ядром. Чтобы узнать, на каком именно ядре происходит это сверхтонкое расщепление, снимался спектр реакционной смеси через 60 мин после начала реакции и при меньшей амплитуде модуляции.

Взаимосвязь между наблюдаемой шириной линии ΔH_{pp_wis} , уширенной за счёт модуляции магнитного поля с амплитудой $1/2 H_m$, и истинной шириной линии H_{pp} согласно [10–12] может быть представлена следующим соотношением:

$$\Delta H_{pp_wis} = \Delta H_{pp} \left\{ \left(\frac{H_m}{\Delta H_{pp}} \right)^2 + 5 - 2 \left[4 + \left(\frac{H_m}{\Delta H_{pp}} \right)^2 \right]^{1/2} \right\}^{1/2}.$$

Очевидно, что уменьшение амплитуды модуляции действительно приводит к уменьшению наблюдаемой ширины линии ЭПР, поэтому становятся различимыми линии суперсверхтонкой структуры.

На рис. 7 показаны два ЭПР-спектра, снятые в одно и то же время, для которых амплитуды модуляции различаются практически вдвое.

Из рисунка видно, что шесть синглетных линий имеют одинаковую амплитуду и ширину с константой сверхтонкого взаимодействия A около 5 Гс. Следовательно, такое сверхтонкое расщепление может создавать взаимодействие

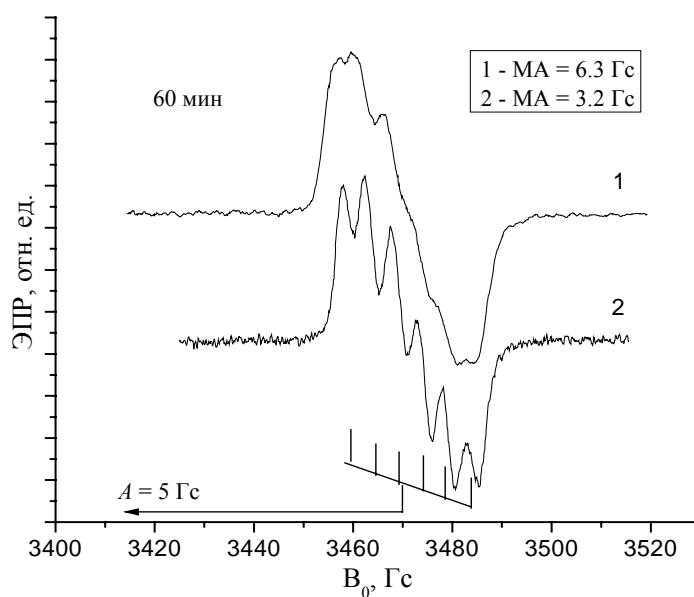


Рис. 7. ЭПР-спектр реакции продолжительностью 60 мин

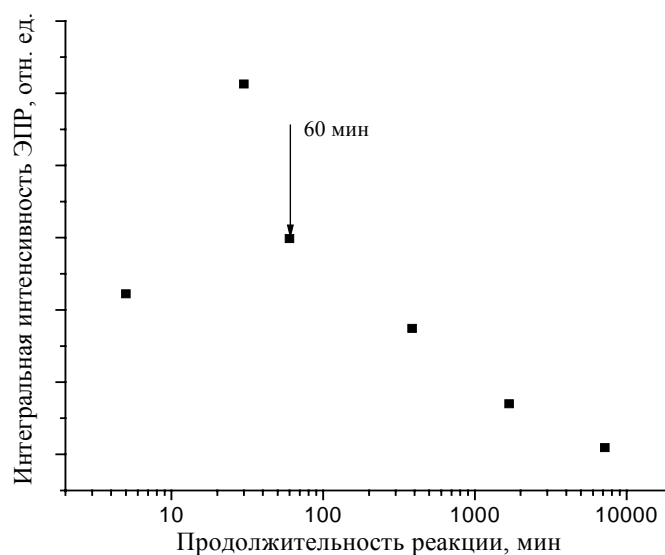


Рис. 8. Интегральная интенсивность спектра ЭПР реакционной смеси в зависимости от продолжительности реакции

неспаренного электрона с ядром со спином $I = 1/2$, то есть это может быть либо фосфор ^{31}P , либо водород ^1H . Более вероятным представляется первый вариант, однако для точного определения взаимодействующего атома в дальнейшем будет проведено исследование данной системы методом ДЭЯР.

Чтобы установить, как меняется в ходе реакции концентрация NO, следовало определить интегральную интенсивность сигнала ЭПР. На рис. 8 показана зависимость этой величины от продолжительности реакции.

Следует подчеркнуть, что в этой работе была реализована возможность применение метода ЭПР для исследования жидкофазных систем, содержащих свободные радикалы. В дальнейшем будет проведён эксперимент с применением ДЭЯР для определения ядра, дающего суперсверхтонкую структуру спектра ЭПР, что даст возможность получить детальную информацию о протекании таких сложных реакций.

Экспериментальная часть

ЭПР-исследования проведены на спектрографе Varian E-12. В работе использовалась смесь абсолютированных растворителей диэтиловый спирт – диэтиловый эфир (1 : 3).

ЯМР ^{31}P спектральные исследования проведены на ЯМР-спектрометре AVANCE-400.

Рентгеноструктурные исследования выполнены на диффрактометре Nonius Карра CCD, оборудованном вращающимся анодным генератором Nonius FR591.

Summary

I.V. Galkina, E.V. Tudriy, S.B. Orlinskiy, M.S. Tagirov, V.I. Galkin. EPR Investigation of NO Generation in the Reaction of Phosphorylation of Dichlorodinitrobenzofuroxan by Triphenylphosphine.

Using the method of EPR, the NO formation in the reaction of phosphorylation of dichlorodinitrobenzofuroxan by triphenylphosphine has been established. An unusual proceeding of the reaction with the participation of benzofuroxan nitrogroups as reactive centers has been proved. The reaction is supposed to result in forming stable diphenolate diphosphabetaïne; unstable nitrosyl chloride is formed as well, that decomposes under reaction conditions into nitrogen oxide and molecular chlorine.

Key words: triphenylphosphine, dichlorodinitrobenzofuroxan, phosphorylation, nitrogen oxide, EPR spectroscopy, heterocyclic compounds.

Литература

1. *Roger W.R., Norris W.P.* The nucleophilic substitutions reactions of 5- and 7-chloro-4,6-dinitrobenzofurazan 1-oxide by aromatic amines // *Aust. J. Chem.* – 1985. – V. 38, No 3. – P. 435–445.
2. Пат. 2255935 РФ. 5,7-Дизамещенный-4,6-динитробензофуороксан общей формулы $\text{C}_6\text{N}_4\text{O}_6(\text{R}_1)_2$, обладающий акарицидной и бактерицидной активностью / Л.М. Юсупова, И.Ф. Фаляхов, Л.В. Спатлова, Т.В. Гарипова. – Оpubл. 10.07.2005, Бюл. № 19. – 2 с.
3. *Haynes J.W.* Bactericides benzofuroxans // *Chem. Abstr.* – 1977. – No 86. – P. 151443.
4. *Bohn H., Brendel J., Martorana P.A., Schonafinger K.* Cardiovascular actions of the furoxan CAS 1609, a novel nitric oxide donor // *Brit. J. Pharmacol.* – 1995. – V. 114. – P. 1605–1612.
5. *Mu Li, Feng S-S., Go M.L.* Study of synthesis and cardiovascular activity of some furoxan derivatives as potential NO-donors // *Chem. Pharm. Bull.* – 2000. – V. 48, No 6. – P. 808–816.

6. *Граник В.Г., Рябова С.Ю., Григорьев Н.Б.* Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект) // Усп. химии. – 1997. – Т. 66, № 8. – С. 792–807.
7. *Граник В.Г., Григорьев Н.Б.* Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с.
8. *Галкина И.В., Тудрий Е.В., Юсупова Л.М., Катаева О.Н., Люфтманн Г., Галкин В.И.* Необычная реакция фосфорилирования дихлординитробензо-фуроксана трифенилфосфином // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150, кн. 1. – С. 22–29.
9. Cambridge Structural Database System. Version 5.27. Cambridge Crystallographic Data Centre. 2006.
10. *Пул Ч.* Техника ЭПР-спектроскопии / Пер. с англ. – М.: Мир, 1970. – 558 с.
11. *Вертц Дж., Болтон Дж.* Теория и практические приложения метода ЭПР / Пер. с англ. – М.: Мир, 1975. – 550 с.
12. *Бучаченко А.Л., Вассерман А.М.* Стабильные радикалы. – М.: Химия, 1973. – 407 с.

Поступила в редакцию
05.07.08

Галкина Ирина Васильевна – кандидат химических наук, доцент кафедры высокомолекулярных и элементоорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: vig54@mail.ru

Тудрий Елена Владимовна – аспирант кафедры высокомолекулярных и элементоорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Орлинский Сергей Борисович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории магнитной радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

Тагиров Мурат Салихович – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой квантовой электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

Галкин Владимир Иванович – доктор химических наук, профессор, член-корреспондент АН РТ, директор Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.