

На правах рукописи



**КУЗНЕЦОВА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА**  
**ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ 2,1,3-БЕНЗОКСАДИАЗОЛОВ**  
**ТЕРМИНАЛЬНЫМИ АЛКИНАМИ И НУКЛЕОФИЛАМИ**

Специальность 02.00.03 – органическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Томск – 2014**

Работа выполнена на кафедре химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,  
Горностаев Леонид Михайлович

Официальные оппоненты: Потапов Андрей Сергеевич  
доктор химических наук, доцент,  
Национальный исследовательский Томский  
политехнический университет, кафедра  
биотехнологии и органической химии,  
инженер-исследователь

Колесник Василий Дмитриевич,  
кандидат химических наук, ООО «НИОСТ»  
(г. Томск), лаборатория нефтехимического  
синтеза, начальник лаборатории

Ведущая организация: Новосибирский институт органической  
химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН.

Защита состоится 24 декабря 2014 г. в 14:30 на заседании диссертационного совета Д.212.269.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ, Малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно–технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 55 и на сайте <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>.

Автореферат разослан «18» ноября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
Д.212.269.04



Т. М. Гиндуллина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** 2,1,3-Бензоксадиазолы (бензофуразаны) обладают рядом полезных свойств, обуславливающих возможность их использования в медицине, сельском хозяйстве и некоторых областях техники. Также бензофуразаны, содержащиеся в молекулах различные функциональные группы широко применяются в качестве флуоресцентных реагентов в различных аналитических и биохимических исследованиях. Интерес к данному классу соединений связан с их своеобразной структурой, физическими и химическими свойствами. Поэтому разработка новых удобных путей синтеза и дальнейших модификаций производных 2,1,3-бензоксадиазола остается одним из ведущих направлений органического синтеза.

Диссертация выполнена на кафедре химии Красноярского государственного педагогического университета им В.П. Астафьева при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (2009-2011г – рег. № 1.1.08; 2012-2014г – рег. № 3.3999.2011).

### Цели работы.

- Изучение взаимодействия 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазола с аренолами и аргентиолами;
- Изучение отношения 4-(R-амино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолов к нитрующим и нитрозирующим реагентами;
- Разработка эффективных способов получения 6-арилокси-4-бром-2,1,3-бензоксадиазолов и 7-бром-N-R-2,1,3-бензоксадиазол-5-аминов на основе 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола;
- Разработка эффективных способов получения бензофуразанов, содержащих в молекулах этинильный фрагмент и аминогруппу, получение на их основе модифицированных нуклеозидов и исследование люминесцентных свойств некоторых производных 2,1,3-бензоксадиазолов и их конъюгатов.

### Научная новизна работы.

- Впервые установлено, что в 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазоле бром, находящийся в положении 4 обладает большей нуклеофильной подвижностью по отношению к арилат- и арилтиолят-ионам.
- Впервые установлено, что взаимодействие 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола с арилат-ионами протекает с замещением атома фтора и образованием 4-(4-R-арилокси)-2,6-дибромнитрозобензолов, субстратов для синтеза 6-(4-R-арилокси)-4-бром-2,1,3-бензоксадиазолов.
- Впервые предложен способ получения 7-бром-N-R-2,1,3-бензоксадиазол-5-аминов в одну технологическую стадию из 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола, и на их основе N-(2-азидоэтил)-7-бром-N-R-2,1,3-бензоксадиазол-5-аминов.
- Впервые показана возможность использования 4,6-дибром- и 4(6)-бром-6(4)-алкиламино-2,1,3-бензоксадиазолов в качестве субстратов в реакции

Соногаширы. Синтезирована группа 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих в молекулах аминогруппу и этинильную группу, непосредственно связанную с карбоциклом.

- Впервые установлено, что 4-(4-метилфениламино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол и 4-бензиламино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол по-разному относятся к нитрующим и нитрозирующим реагентам; на основании полученных данных предложены механизмы реакции.
- Впервые показано, что 4(6)-морфолин-4(6)-ил-6(4)-этинил-2,1,3-бензоксадиазолы и N-(2-азидоэтил)-N-метил-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-амин могут быть использованы в качестве люминесцентных меток нуклеозидов и олигонуклеотидов; установлено, что полученные модифицированные нуклеозиды и олигонуклеотиды обладают люминесцентными свойствами, причём максимумы эмиссии находятся в области, удобной для биохимических исследований (560-596 нм).

#### **Практическая значимость работы.**

1. Разработанные способы получения производных 2,1,3-бензоксадиазолов путем взаимодействия 4,6-дигалоген-2,1,3-бензоксадиазолов с аренолами и арентиолами, 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола с аренолами, а также на основе реакций нитрования, нитрозирования 4-(R-амино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолов, кросс-сочетания 4,6-дибром- и 4(6)-бром-6(4)-алкиламино-2,1,3-бензоксадиазолов с терминальными алкинами, позволили синтезировать новые группы бензофуразанов, перспективных для исследования их биохимической активности.
2. Найденные методы получения люминесцентных модифицированных нуклеозидов или олигонуклеотидов на основе 2,1,3-бензоксадиазолов позволяют рассматривать полученные конъюгаты в качестве флуоресцентных меток в медицинской диагностике и биохимических исследованиях.

**Апробация работы.** Результаты настоящей работы были представлены на Всероссийской конференции по органической химии, посвящённой 75-летию со дня основания Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, 2009); International Symposium «Advanced Science in Organic Chemistry» (Крым, 2010); Всероссийской конференции «Современные проблемы органической химии», посвящённой 80-летию со дня рождения академика В.А. Коптюга (Новосибирск, 2011); XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Волгоград, 2011); III Всероссийской конференции по органической химии (Санкт-Петербург, 2013); XV Международной научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 4 статьи (из них 1 статья в международном журнале), материалы 14 докладов, тезисы 4 докладов.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 28 рисунков, 6 таблиц. Состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы (101 ссылка) без приложений.

**Положения, выносимые на защиту.**

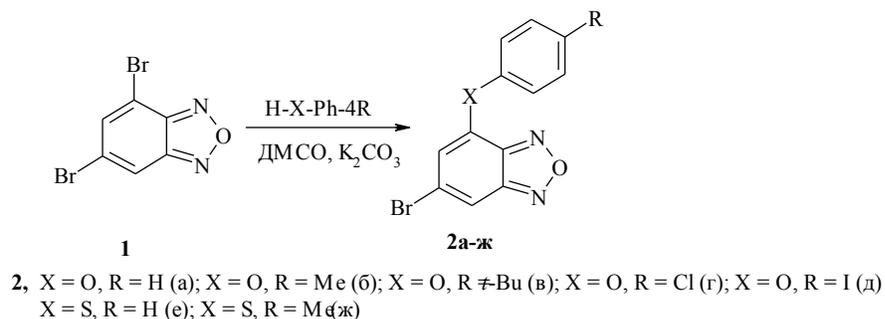
1. Синтез и химические свойства 4-арилокси(арилтио)-6-бром-2,1,3-бензоксадиазолов.
2. Синтез 6-арилокси- и 6-амино-4-бром-2,1,3-бензоксадиазолов на основе 2,6-дибром-4-фтор-нитрозобензола.
3. Функционализация N-алкил-6(4)-бром-2,1,3-бензоксадиазол-4(6)-аминов терминальными алкинами.
4. Взаимодействие 4-(R-амино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолов с нитрующими и нитрозирующими реагентами.
5. Флуоресцентные свойства некоторых 2,1,3-бензоксадиазолов и их применение в качестве флуоресцентных меток.

**Основное содержание работы**

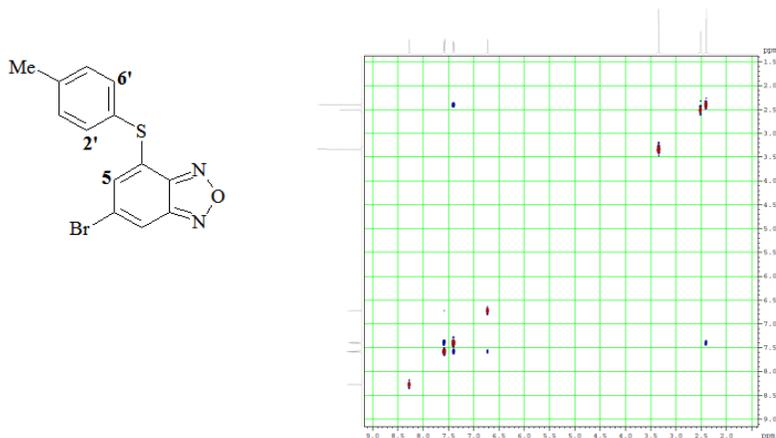
**1. Синтез и химические свойства 4-арилокси(арилтио)-6-бром-2,1,3-бензоксадиазолов**

Реакции 4,6-дигалоген-2,1,3-бензоксадиазолов с аренолами и арентиолами ранее не были изучены. Установлено, что 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазол **1** взаимодействует с фенолами или тиофенолами с замещением атома брома, находящегося в положении 4, а не 6 и образованием 4-арилокси(арилтио)-6-бром-2,1,3-бензоксадиазолов. Реакция проводилась в ДМСО в присутствии карбоната калия.

**Схема 1**



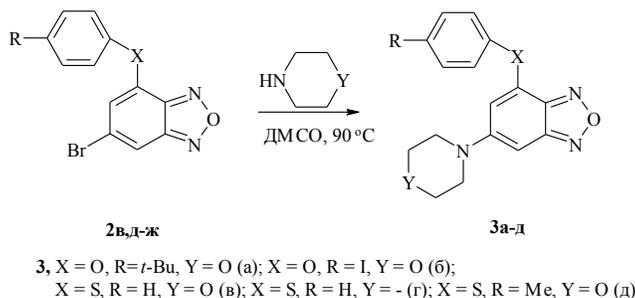
Строение и состав полученных веществ подтверждены данными элементного анализа, ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопии, масс-спектрометрии и двумерной ядерной спектроскопии NOESY. В двумерном спектре вещества (**2ж**) присутствуют кросс-пики, соответствующие взаимодействию протонов, находящихся в положениях 2',6' пара-метилтиофенольного остатка (7.40 м.д.) и протона, находящегося в 5-м положении карбоцикла бензофуразана (6.73 м.д.).



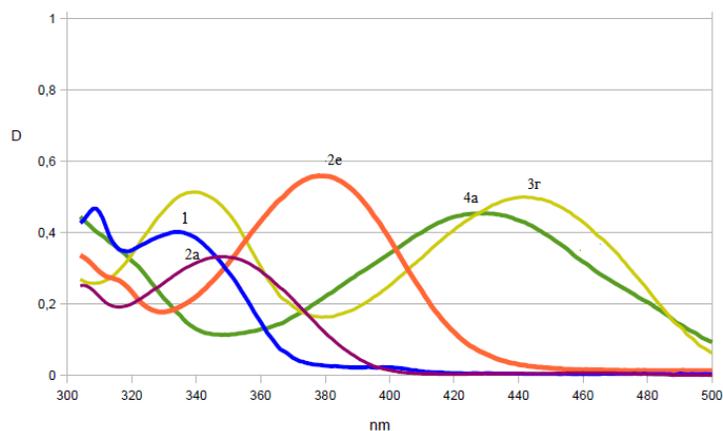
**Рисунок 1.** NOESY-спектр 6-бром-4-(4-метилфенил)тио-2,1,3-бензоксадиазола (**2ж**)

Для получения соединений, характеризующихся спектрами поглощения и флуоресценции в благоприятных для биохимических исследований областях, изучено взаимодействие полученных веществ **2** с алифатическими аминами. Аминирование веществ **2в,д-ж** пирролидином и морфолином протекает в ДМСО при 80-90 °С с образованием продуктов **3**.

### Схема 2



Представлялось интересным изучить влияние различных заместителей на характер электронных спектров поглощения 4-арилокси(арилтио)-6-бром-2,1,3-бензоксадиазолов **2** и продуктов их аминирования **3** (рисунок 2). Установлено, что введение арилоксигруппы в положение 4 вместо атома брома в 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазоле **1** приводит к батохромному сдвигу длинноволновых максимумов на 10-15 нм, а арилтиогруппы на 40-50 нм. В электронном спектре поглощения 2,1,3-бензоксадиазола **3г**, содержащего в положении 4 4-фенилтиогруппу, а б – остаток пирролидина наблюдается батохромный сдвиг на 65 нм по сравнению с 6-бром-4-фенилтио-2,1,3-бензоксадиазолом **2е** и на 30 нм по сравнению с 6-бром-4-морфолино-2,1,3-бензоксадиазолом **4а**. Таким образом, введение в молекулы бензоксадиазолов двух электронодонорных заместителей приводит к смещению максимумов поглощения в длинноволновую область по сравнению с монозамещенными бензофуразами.



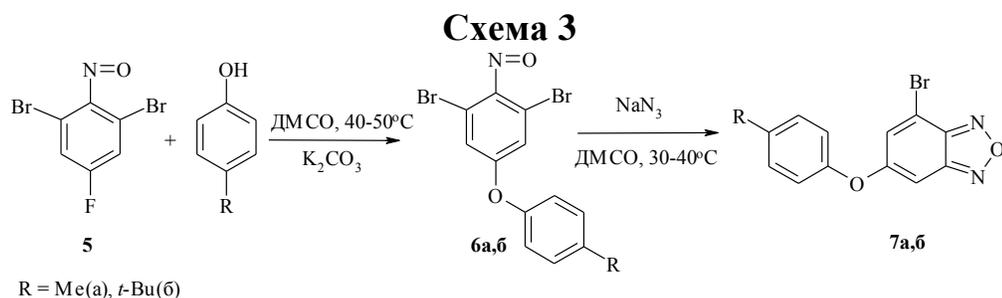
**Рисунок 2.** ЭСП 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазола (**1**), 6-бром-4-фенокси-2,1,3-бензоксадиазола (**2a**), 6-бром-4-фенилтио-2,1,3-бензоксадиазола (**2e**), 6-пироллидино-4-фенилтио-2,1,3-бензоксадиазола (**3r**), 6-бром-4-морфолино-2,1,3-бензоксадиазола (**4a**) (ДМФА,  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л)

## 2. Синтез 6-арилокси и 6-алкиламино-4-бром-2,1,3-бензоксадиазолов на основе 2,6-дибром-4-фтор-нитрозобензола

### 2.1. Синтез 6-арилокси-4-бром-2,1,3-бензоксадиазолов на основе 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола

Найдено, что 2,6-дибром-4-фторнитрозобензол **5** взаимодействует с аренолами в ДМСО в присутствии карбоната калия с замещением атома фтора и образованием 2,6-дибром-4-арилоксинитрозобензолов **6a,б**. Замещению атома фтора, а не конденсации с участием нитрозогруппы способствует высокая нуклеофугность атома фтора и наличие в *орто*-положениях к нитрозогруппе двух атомов брома, затрудняющих ее пространственную доступность в 2,6-дибром-4-фторнитрозобензоле **5**.

Продукты **6a,б** оказались хорошими субстратами для синтеза 2,1,3-бензоксадиазолов. На основе соединений **6a,б** были получены 4-бром-6-(4-R-фенокси)-2,1,3-бензоксадиазолы **7a,б**.



## 2.2. Синтез и химические свойства 7-бром-N-R-2,1,3-бензоксадиазол-5-аминов и 2-[(7-бром-2,1,3-бензоксадиазол-5-ил)-R-амино]этанолов

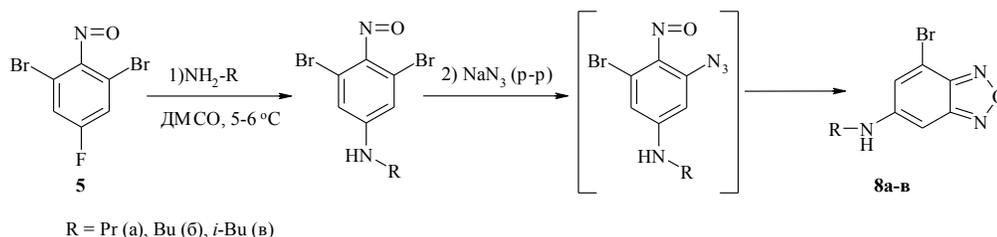
Предложен способ получения аминопроизводных 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих вторичную аминогруппу в положении 6 без выделения соответствующих аминонитрозобензолов.

Синтез осуществляется последовательно и включает две стадии:

а) Замещение атома фтора в 2,6-дибром-4-фторнитрозобензоле **5** под действием первичного амина. Эта стадия проводится при внешнем охлаждении, к раствору 4-фтор-2,6-дибромнитрозобензола **5** в ДМСО приливается небольшой избыток первичного амина. После завершения стадии аминирования исходного 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола реакционную массу нагревают до комнатной температуры.

б) Циклизация 2-бром-6-азидо-4-аминонитрозобензолов. К реакционной массе прибавляется водный раствор азидата натрия, после чего реакционная масса нагревается до 50-60 °С и выдерживается в течение 40 мин.

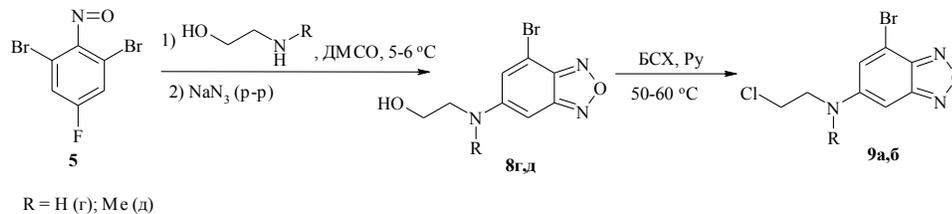
### Схема 4



Проведение синтеза таким способом является более удобным и позволяет синтезировать 2,1,3-бензоксадиазолы, содержащие в молекулах вторичную аминогруппу. Таким же способом можно получить и бензофуразаны, содержащие в молекулах остатки аминспиртов **8г,д**.

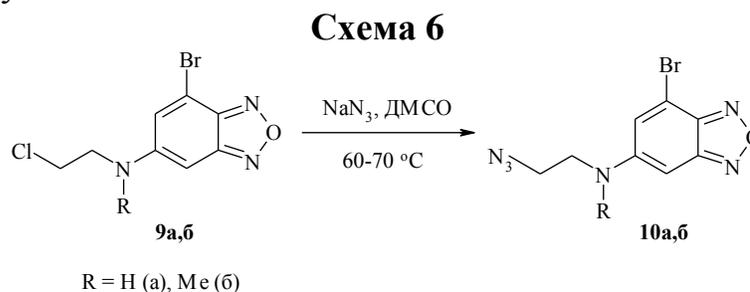
Дальнейшая функционализация веществ **8г,д** проводилась с использованием бензолсульфохлорида (БСХ) в пиридине при 50-60 °С. В полученных веществах **8г,д** гидроксильная группа замещается атомом хлора.

### Схема 5



Вещества **9а,б** содержат подвижный атом хлора, удаленный от карбоцикла и способный подвергаться нуклеофильному замещению. В связи с этим соединения

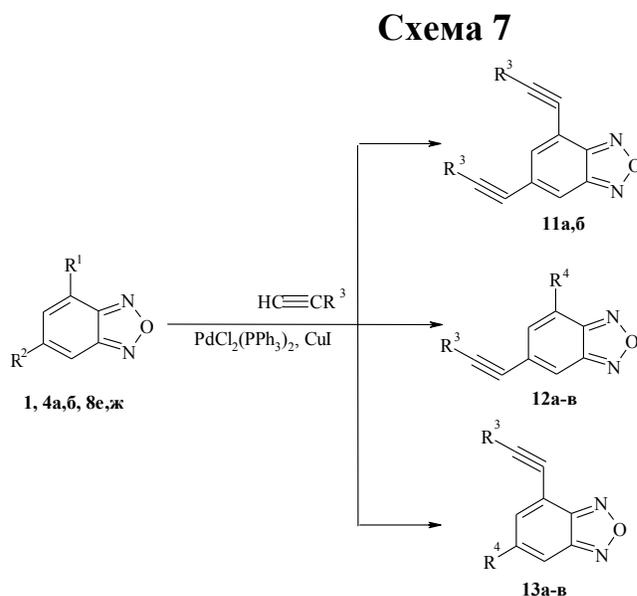
**9а,б** вводились в реакцию с избытком азид натрия, что приводит к замещению атома хлора азидогруппой.



Синтезированные соединения **10а,б** содержат линкерную азидогруппу и проявляют люминесцентные свойства, что открывает возможность их использования в качестве флуоресцентных меток модифицированных биомолекул.

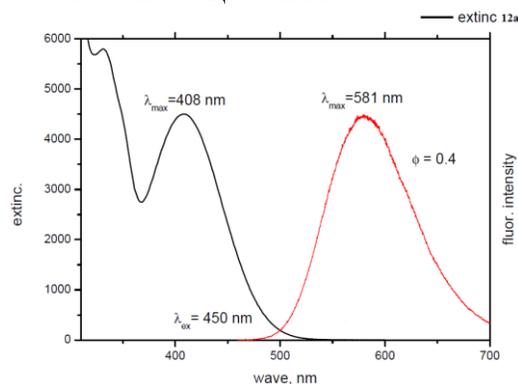
### 3. Изучение реакций N-алкил-6(4)-бром-2,1,3-бензоксадиазол-4(6)-аминов с терминальными алкинами

Данные об использовании 4,6-дибром- и 4(6)-бром-6(4)-алкиламино-2,1,3-бензоксадиазолов **1**, **4**, **8** в качестве субстратов в реакции кросс-сочетания нам не известны. Установлено, что бромбензоксадиазолы, содержащие атомы брома в положениях **4** **4а,б** или **6** **8е,ж**, а также в обоих положениях **1**, реагируют с фенилацетиленом и 2-метилбут-3-ин-2-олом в кипящем бензоле в присутствии трифенилфосфина, хлорида палладия (II), иодида меди и триэтиламина в атмосфере аргона. Продукты реакции – соответствующие алкинилбензофуразаны **11-13** – выделялись обычным способом.

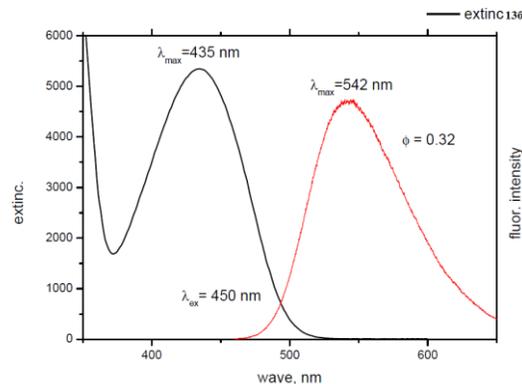


**1**, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Br; **4**, R<sup>2</sup> = Br, R<sup>1</sup> = N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (а), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (б); **8**, R<sup>1</sup> = Br, R<sup>2</sup> = N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (е), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (ж);  
**11**, R<sup>3</sup> = Ph (а), C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH (б); **12,13**, R<sup>3</sup> = Ph, R<sup>4</sup> = N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (а), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (б);  
R<sup>3</sup> = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, R<sup>4</sup> = N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (в)

Бензофуразаны, содержащие в молекулах ацетиленовый фрагмент, связанный с карбоциклом проявляют люминесцентные свойства и имеют максимумы эмиссии в области 500-600 нм. На рисунках 3 и 4 приведены спектры флуоресценции соединений **12a**, **13b**. Максимумы эмиссии 4-морфолино-6-фенилэтинил-2,1,3-бензоксадиазола **12a** и 4-фенилэтинил-6-диметиламино-2,1,3-бензоксадиазола **13b** находятся в длинноволновой области и составляют 581 и 542 нм соответственно. Поглощение и флуоресценция исследуемых веществ **11-13** именно в указанных областях делают возможным их использование в качестве биолюминесцентных меток.



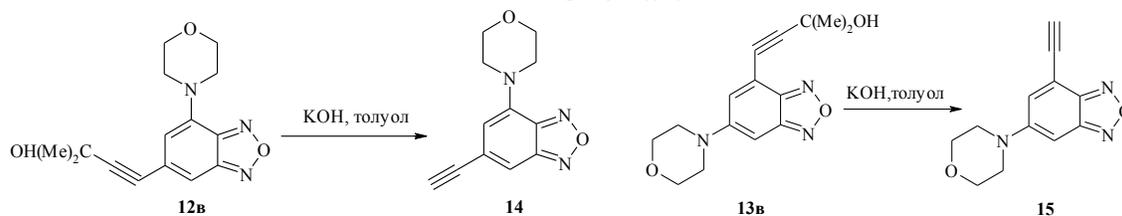
**Рисунок 3.** Спектры поглощения и флуоресценции 4-морфолино-6-фенилэтинил-2,1,3-бензоксадиазола **12a** (Ацетонитрил,  $C=3.3 \cdot 10^{-5}$  моль/л)



**Рисунок 4.** Спектры поглощения и флуоресценции 4-фенилэтинил-6-диметиламино-2,1,3-бензоксадиазола **13b** (Ацетонитрил,  $C=1.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л)

Соединения **12в** и **13в** могут быть использованы как промежуточные вещества для синтеза бензофуразанов, содержащих в молекуле этинильный остаток и аминогруппу. Установлено, что наиболее удобным вариантом проведения данной реакции является кипячение бензофуразанов **12в**, **13в** в толуоле в присутствии гидроксида калия.

### Схема 8

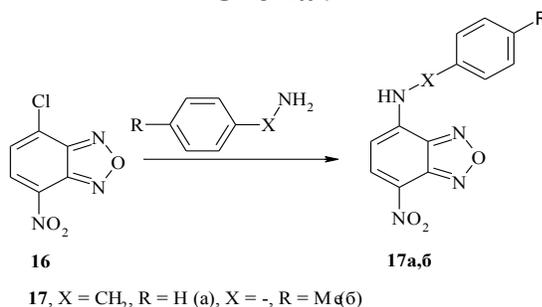


Полученные бензофуразаны **14**, **15** за счет наличия в молекулах электронодонорных заместителей имеют спектры эмиссии и поглощения в длинноволновой области спектра, там, где для большинства биомолекул поглощение электромагнитного излучения не характерно. Присутствие терминального этинильного фрагмента позволяет использовать соединения **14**, **15** в «клик»-химии в качестве флуоресцентных меток модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов.

#### 4. Изучение реакций 4-R-амино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолов с нитрующими и нитрозирующими реагентами

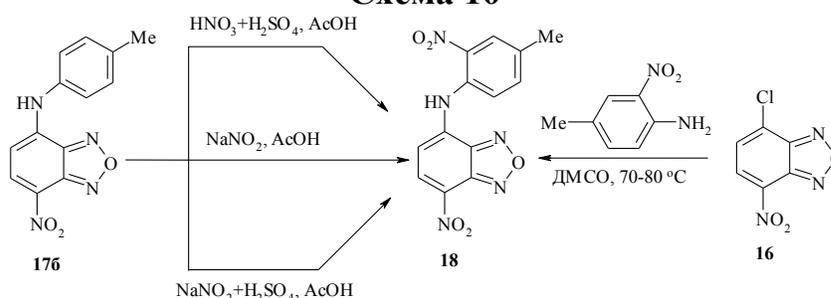
В поисковых системах Reaxys и SciFinder информация о нитровании и нитрозировании аминобензофуразанов практически отсутствует. Согласно известным методикам нами получены 2,1,3-бензоксадиазолы **17а,б**, содержащие в молекулах остатки вторичных ароматических аминов.

Схема 9



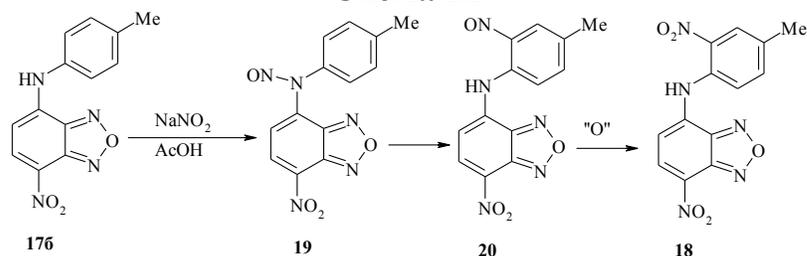
Бензофуразаны **17а,б** содержат функциональные группы, чувствительные к действию нитрующих и нитрозирующих реагентов. Установлено, что субстрат **17б** при обработке нитрующей смесью или нитрозилсерной кислотой нитруется в активное положение бензольного кольца. Вступление нитрогруппы именно в *орто*-положение по отношению к аминогруппе подтверждено встречным синтезом – взаимодействием 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола **16** с 2-нитротолуидином. Интересно, что продукт **18** также образуется и при обработке субстрата **17б** нитритом натрия в уксусной кислоте.

Схема 10



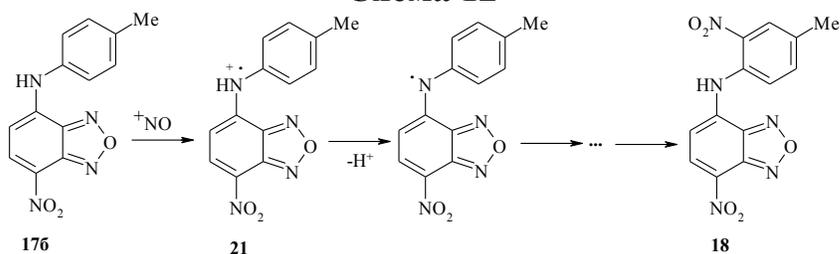
Образование 4-(2-нитро-4-метилфениламино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола **18** может объясняться механизмом, включающим на одной из стадий перегруппировку по Фишеру-Хеппу: в результате взаимодействия соединения **17б** с нитрозирующими реагентами сначала образуется N-нитрозосоединение **19**, которое далее перегруппировывается в C-нитрозосоединение **20**, а последнее затем окисляется кислородом воздуха в динитропроизводное 2,1,3-бензоксадиазола **18**.

## Схема 11



Превращение **176**→**18** при действии нитрозилсерной кислоты может протекать по катион-радикальному пути. Катион нитрозония, генерированный из нитрозилсерной кислоты, атакует вторичную аминогруппу, образующийся при этом катион-радикал **21** может через ряд промежуточных продуктов превращаться в 4-(2-нитро-4-метилфениламино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол **18**.

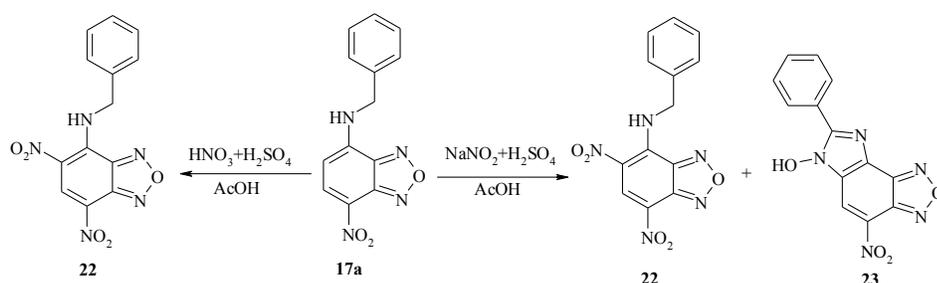
## Схема 12



Кроме предложенных выше маршрутов нельзя исключить и прямое нитрозирование субстрата **176** в C-нитрозосоединение **20**.

Нами найдено, что 4-бензиламино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол **17a** относится к нитрующим и нитрозирующим реагентам иначе, чем бензофуразан **176**. Реакция соединения **17a** с нитрующей смесью протекает с участием карбоцикла бензофуразанового фрагмента, а не фенильного остатка бензильного радикала. Очевидно, что бензиламиногруппа активирует карбоцикл бензоксадиазола **17a** к электрофильному нитрованию, а фенильная группа в исходном веществе оказывается менее активной. В то же время обработка субстрата **17a** нитрозилсерной кислотой приводит к образованию двух продуктов – 4-бензиламино-5,7-динитро-2,1,3-бензоксадиазола **22** и гидроксимидазола **23**.

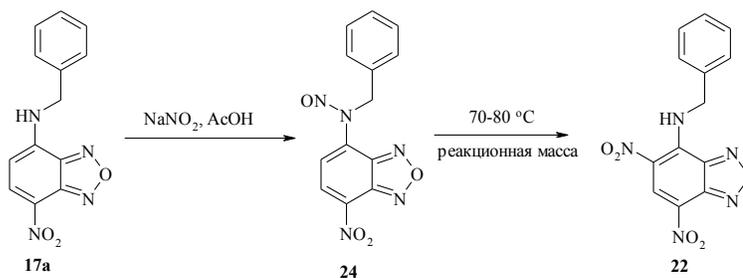
## Схема 13



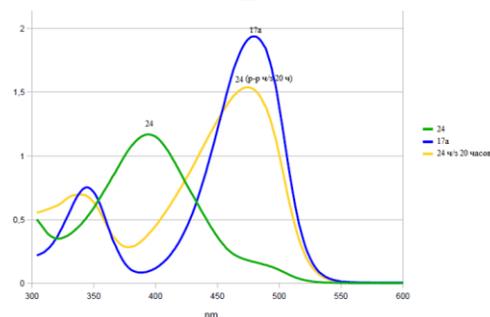
По-видимому, циклизация вещества **17a** в гидроксимидазол **23** протекает по радикальному механизму.

Установлено, что нагревание реакционной массы, полученной после взаимодействия 4-бензиламино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола **17a** с азотистой кислотой приводит к образованию продукта **22**. Вероятно, что первичным продуктом реакции субстрата **17a** с азотистой кислотой является N-нитрозосоединение **24**, которое в результате нагревания превращается в динитропроизводное **22**.

#### Схема 14



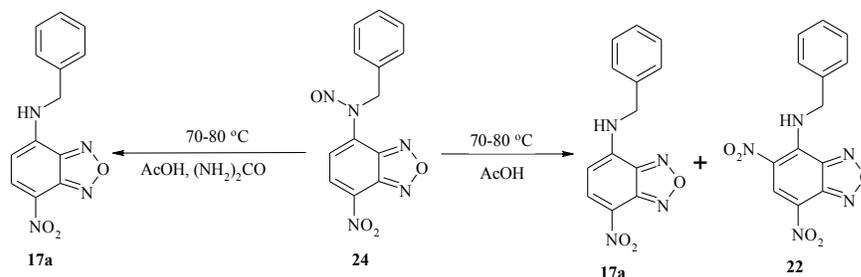
Данные УФ- и ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопии подтверждают структуру, предложенную для 2,1,3-бензоксадиазола **24**, который образуется со степенью чистоты ~90%. На рисунке 5 представлены ЭСП бензофуразанов **17a** и **24**, максимум поглощения соединения **17a** составляет 450 нм, а вещества **24** – 380 нм. После выдержки реакционной массы в течение 20 ч, были повторно записаны ЭСП реакционной массы, при этом профиль спектра и максимумы поглощения были практически идентичными соединению **17a**. Вероятнее всего протекает денитрозирование и образование исходного бензофурана **17a**.



**Рисунок 5.** ЭСП 4-бензиламино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола (**17a**), 4-(N-нитрозобензиламино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола (**24**), реакционная масса после 20-ти часовой выдержки (**24**) (ДМСО,  $C=1 \cdot 10^{-4}$  моль/л)

Установлено, что нагревание бензофурана **24** в уксусной кислоте приводит к образованию двух продуктов – исходного 4-бензиламино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола **17a** и 4-бензиламино-5,7-динитро-2,1,3-бензоксадиазола **22**. Нагревание того же субстрата **24** в присутствии мочевины приводит только к образованию исходного бензиламинобензофурана.

## Схема 15

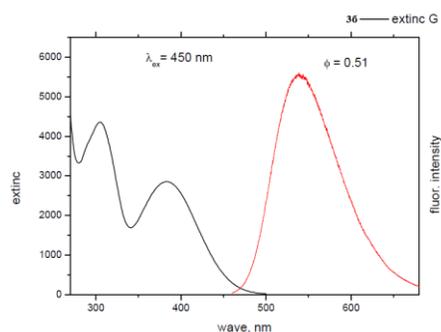


По-видимому, нагревание N-нитрозосоединения **24** в уксусной кислоте с мочевиной приводит к его денитрозированию и реагированию катиона нитрозония с мочевиной, что исключает перегруппировку Фишера-Хеппа. В отсутствие мочевины, очевидно, имеет место и денитрозирование, и перегруппировка Фишера-Хеппа, а затем дальнейшее окисление C-нитрозосоединения до динитробензофуразана.

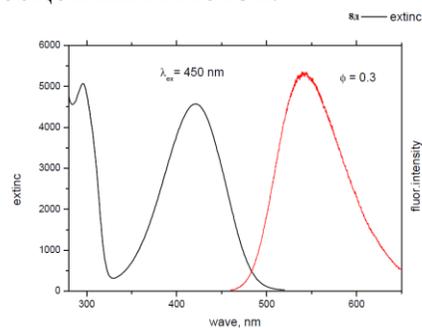
Производные 2,1,3-бензоксадиазола, содержащие нитрогруппу в карбоцикле бензофуразана или в арильном остатке, пригодны для дальнейших модификаций.

## 5. Флуоресцентные свойства 2,1,3-бензоксадиазолов и их применение в качестве флуоресцентных меток

Бензофуразаны, содержащие в молекулах электронодонорные заместители, имеют максимумы эмиссии в длинноволновой области. Так, максимум эмиссии для 6-морфолино-4-(4-йодфенокси)-2,1,3-бензоксадиазола **3б** составляет 540 нм (рисунок 6), а для 2-[(7-бром-2,1,3-бензоксадиазол-5-ил)-метиламино]этанола **8д** 573 нм (рисунок 7). Такие спектральные данные позволяют использовать производные 2,1,3-бензоксадиазолов в качестве флуоресцентных меток.



**Рисунок 6.** Спектры поглощения и флуоресценции 6-морфолино-4-(4-йодфенокси)-2,1,3-бензоксадиазола **3б** (Ацетонитрил,  $C=1.8 \cdot 10^{-4}$  моль/л)

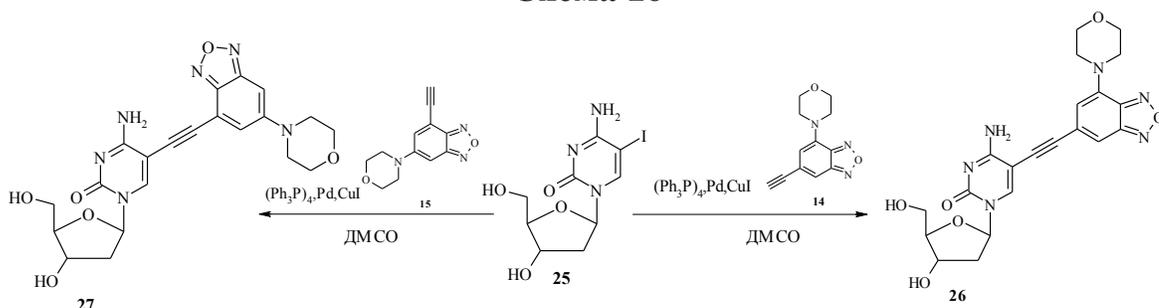


**Рисунок 7.** Спектры поглощения и флуоресценции 2-[(7-бром-2,1,3-бензоксадиазол-5-ил)-метиламино]этанола **8д**, (Ацетонитрил,  $C=3.2 \cdot 10^{-5}$  моль/л)

Автор благодарит за помощь в записи спектров флуоресценции В.В. Королева, к.х.н., доцента, научного сотрудника лаборатории механизмов реакций Института химической кинетики и горения СО РАН.

Нами была исследована возможность введения 2,1,3-бензоксадиазолов **14,15**, содержащих в молекулах терминальную тройную связь и аминогруппу, в модифицированные нуклеозиды. Введение флуоресцентных красителей в положение 5 2'-дезокситидина **26** проводилось с помощью реакции Соногаширы.

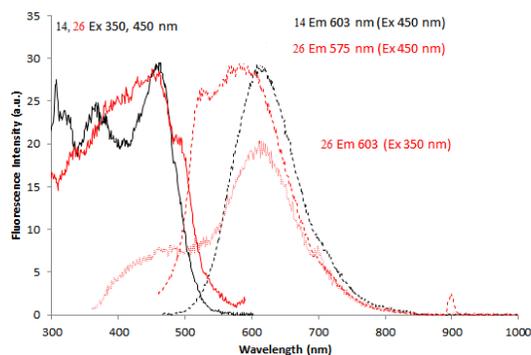
### Схема 16



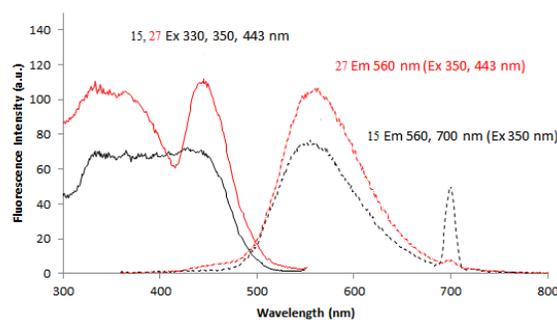
При превращении **25**→**26** или **25**→**27** в качестве растворителя использовался ДМСО, реакция проводилась в течение нескольких дней при температуре 70-80 °С; выход целевых продуктов составил 30-40%.

Полученные нуклеозидные производные **26, 27** могут быть использованы для получения амидофосфитных мономеров для стандартного твердофазного синтеза или трифосфатов для ферментативного синтеза модифицированных (флуоресцентными красителями) олигонуклеотидов.

Для соединений **14,15** и полученных на их основе нуклеозидов **26, 27** были записаны спектры флуоресценции (рисунке 8, 9).



**Рисунок 8.** Спектры возбуждения и флуоресценции 4-морфолин-4-ил-6-этинил-2,1,3-бензоксадиазола **14** и 5-(2-(4-этинил-6-морфолинобензо[с][1,2,5]оксадиазолил))-2'-дезокситидин **26** (Трис НСl буфер 0.1M:EtOH=1:1, C=7·10<sup>-5</sup> моль/л)

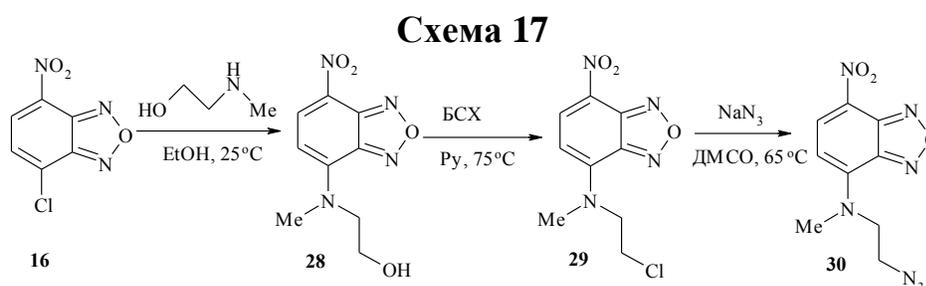


**Рисунок 9.** Спектры возбуждения и флуоресценции 6-морфолин-6-ил-4-этинил-2,1,3-бензоксадиазола **15** и 5-(2-(6-этинил-4-морфолинобензо[с][1,2,5]оксадиазолил))-2'-дезокситидин **27** (Трис НСl буфер 0.1M:EtOH=1:1, C=7·10<sup>-5</sup> моль/л)

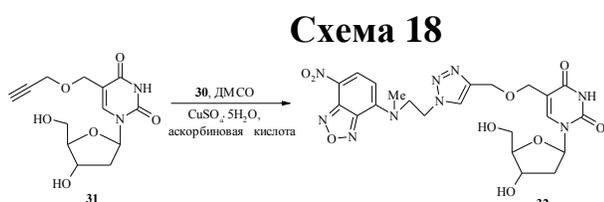
Данная часть работы была выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН совместно с сотрудниками лаборатории органического синтеза, к.х.н. Васильевой С.В. и д.х.н. Сильниковым В.Н.

Максимум эмиссии для соединения **26** незначительно сдвинулся в коротковолновую область (с 603 нм до 575 нм). Для соединения **27** максимум эмиссии остается таким же, как и для соединения **15** и составляет 560 нм. Длинноволновая эмиссия 564-596 нм и ее достаточно высокая интенсивность для полученных нуклеозидов **26**, **27** позволяют использовать их в качестве флуоресцентных меток олигонуклеотидов.

Флуоресцентные красители, содержащие линкерную азидогруппу, могут быть введены в молекулы нуклеозидов или олигонуклеотидов с помощью реакции 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения. N-(2-Азидоэтил)-N-метил-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-амин **30** был синтезирован из 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола **16** по следующей схеме.

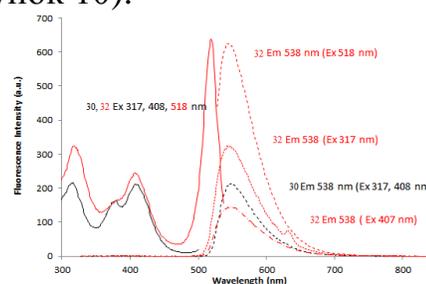


Полученное соединение **30** с помощью клик-реакции вводилось в 5-пропаргиллоксиметил-2'-дезоксуридин **31**.



Реакция протекает при температуре 23-25 °С в течение 10-18 ч и согласно ВЭЖХ-анализу происходит 100% конверсия исходного 5-пропаргиллоксиметил-2'-дезоксуридина **31** в продукт **32**. Полученные вещества выделялись и очищались экстракцией, хроматографией на силикагеле и на силикагеле с обращенной фазой. В результате был получен чистый продукт **32** с выходом 53%.

Для исходного соединения **30** и полученного на его основе нуклеозида **32** были записаны спектры флуоресценции, максимумы эмиссии соединений **30** и **32** совпадают и составляют 538 нм (рисунок 10).



**Рисунок 10.** Спектры возбуждения и флуоресценции N-(2-Азидоэтил)-N-метил-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-амин **30** и 5-(1-(2-(метил(7-нитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)амино)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил-2'-дезоксуридин **32** (Трис HCl буфер 0.1M:EtOH=1:1, C=7·10<sup>-5</sup> моль/л).

**Выводы:**

1. Установлено, что в 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазоле бром, находящийся в положении 4 обладает большей нуклеофильной подвижностью по отношению к арилат- и арилтиолят-ионам.
2. Обнаружено, что 2,6-дибром-4-фторнитрозобензол реагирует с 4-R-фенолами с образованием 4-(4-R-арилокси)-2,6-дибромнитрозобензолов, субстратов для синтеза 6-(4-R-арилокси)-6-бром-2,1,3-бензоксадиазолов.
3. Предложен способ получения 7-бром-N-R-2,1,3-бензоксадиазол-5-аминов в одну технологическую стадию из 2,6-дибром-4-фторнитрозобензола и на их основе N-(2-азидоэтил)-7-бром-N-R-2,1,3-бензоксадиазол-5-аминов.
4. Предложен способ получения 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих в молекулах остатки терминальных алкинов и аминогруппу, пригодных для использования в качестве люминесцентных меток.
5. Установлено различное отношение 4-(R-амино)-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолов к нитрующим и нитрозирующим реагентам.
6. Показана возможность использования производных 2,1,3-бензоксадиазолов в качестве люминесцентных меток нуклеозидов. С помощью реакции Соногаширы на основе 4(6)-морфолин-4(6)-ил-6(4)-этинил-2,1,3-бензоксадиазолов получены люминесцентные производные дезоксицитидина, а с помощью «клик»-реакции на основе N-(2-азидоэтил)-N-метил-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-амин – производные дезоксиуридина.

**Основное содержание диссертации опубликовано в работах:**

1. Кузнецова, А.С. Синтез 4(6)-арилокси- и 4-арилтио-2,1,3-бензоксадиазолов / А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев, Г.А. Сташина, С.И. Фирганг // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2013. – № 9. – С. 2079 – 2083.
2. Горностаев, Л.М. Взаимодействие N-алкил-6(4)-бром-2,1,3-бензоксадиазол-4(6)-аминов с терминальными алкинами / Л.М. Горностаев, А.С. Кузнецова, Н.В. Геец, Е.А. Бочарова // Журнал органической химии. – 2012. – Т.48. – Вып.1. – С. 142 – 144.
3. Кузнецова, А.С. Реакции 4-R-амино-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолов с нитрующими и нитрозирующими реагентами / А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев // Бутлеровские сообщения – 2013. – Т. 33. – №3. – С. 88-92.
4. Vasilyeva, S.V. Novel fluorescent pyrimidine nucleosides containing 2,1,3-benzoxadiazole and naphtho-[1,2,3-cd]indole-6 (2H)-one fragments / S.V. Vasilyeva, A. S. Kuznetsova, J. G. Khalyavina, V. A. Glazunova, A. A. Shtil, L. M. Gornostaev, V. N. Silnikov // Nucleosides, Nucleotides, Nucleic acids – 2014. - Vol. 33:9. – P.615 – 625.
5. Кузнецова, А.С. О взаимодействии 4-R-амино-7-нитробензофуразанов с азотистой кислотой / А.С. Кузнецова, А.Е. Девяшина, Е.А. Бочарова, Л.М. Горностаев // Материалы III Региональной научно-практической конференции, посвященной 175-летию со дня рождения Д.И. Менделеева и 140-летию со дня открытия Периодического закона химических элементов «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2009. – С. 36 – 41.
6. Горностаев, Л.М. Реакции некоторых галогеннитропроизводных бензо[1,2,5]оксадиазолов с нуклеофильными и электрофильными реагентами / Л.М. Горностаев, А.Е. Девяшина, А.С. Кузнецова, Е.А. Бочарова, Г.А. Сташина, С.И. Фирганг // Материалы Всероссийской конференции по органической химии, посвященной 75-летию Института органической химии им. Н.Д. Зелинского. – Москва, ИОХ им. Н.Д. Зелинского. – 2009. – С. 151.
7. Кузнецова, А.С. Отношение 4-R-амино-7-нитробензофуразанов к нитрующим и нитрозирующим реагентам / А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев // Материалы IV Региональной научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2010. – С. 75 – 80.
8. Геец, Н.В. Взаимодействие производных 2,1,3-бензоксадиазолов с фенилацетиленом / Н.В. Геец, Е.А. Бочарова, А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев // Материалы IV Региональной научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2010. – С. 26 – 30.

9. Кузнецова, А.С. Синтез 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих алкильные заместители / А.С. Кузнецова, Е.А. Бочарова, Н.В. Геец, Л.М. Горностаев // Тезисы International Symposium «Advanced Science in Organic Chemistry». – Mischor, Crimea. – 2010. – С.177.
10. Геец, Н.В. Изучение взаимодействия производных 2,1,3-бензоксадиазолов с терминальными алкинами / Н.В. Геец, А.С. Кузнецова, Е.А. Бочарова // Материалы V Региональной научно-практической конференции, посвященной Году химии «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2011. – С. 24 – 26.
11. Geets, N. V. Synthesis and properties of some alkynylbenzofurazanes / N. V. Geets, L.M. Gornostaev, E.A. Bocharova, A.S. Kuznetsova // Abstracts of International conference «Current topics in organic chemistry». – Novosibirsk. – 2011. – С.117.
12. Горностаев, Л.М. Отношение галогеннитропроизводных бензо[1,2,5]оксадиазолов к нитрующим и нитрозирующим реагентам / Л.М. Горностаев, А.С. Кузнецова, Е.А. Бочарова, Г.А. Сташина, С.И. Фирганг // Тезисы XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. – Волгоград. – 2011. – Т. 1. – С. 167.
13. Кузнецова, А.С. Взаимодействие 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазола с некоторыми S- и O-нуклеофилами / А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев // Материалы VI Региональной научно-практической конференции, посвященной 80-летию Красноярского государственного педагогического университета им. В.П. Астафьева и 70-летию Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2012. – С. 56 – 59.
14. Васильева, С.В. Синтез флуоресцентных аналогов дезоксицитидина / С.В. Васильева, В.Н. Сильников, Л.М. Горностаев, Н.В. Геец, А.С. Кузнецова // Материалы VI Региональной научно-практической конференции, посвященной 80-летию Красноярского государственного педагогического университета им. В.П. Астафьева и 70-летию Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2012. – С.56 – 59.
15. Талдыкина, Д.С. Синтез производных 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих азидогруппу / Д.С. Талдыкина, Ю.А. Шупыро, Н.В. Таранин, А.С. Кузнецова // Материалы XIV Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 2013. – С. 28.
16. Кузнецова, А.С. Синтез новых 2,1,3-бензоксадиазолов и их связывание с аналогами дезоксицитидина / А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев, С.В.

- Васильева, В.Н. Сильников // Тезисы кластера конференций по органической химии «ОргХим-2013». – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 158.
17. Талдыкина, Д.С. Синтез 4-арилокси-6-амино-2,1,3-бензоксадиазолов / Д.С. Талдыкина, Ю.А. Шупыро, А.С. Кузнецова, Л.М. Горностаев // Тезисы Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию химического факультета ИГУ «Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи». – Иркутск. – 2013. – С. 147 – 148.
  18. Талдыкина, Д.С. Различные пути синтеза производных 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих линкерную функциональную группу / Д.С. Талдыкина, Ю.А. Шупыро, А.С. Кузнецова // Материалы VII Региональной научно-практической конференции, посвященной 180-летию со дня рождения Д.И. Менделеева «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 16 мая, 2014. – С. 56 – 57.
  19. Шупыро, Ю.А. Синтез и химические свойства 4-арилокси(арилтио)-6-бром-2,1,3-бензоксадиазолов / Ю.А. Шупыро, Д.С. Талдыкина, А.С. Кузнецова // Материалы VII Региональной научно-практической конференции, посвященной 180-летию со дня рождения Д.И. Менделеева «Химическая наука и образование Красноярья». – Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. – 16 мая, 2014. – С. 57 – 59.
  20. Кузнецова, А.С. Новый способ получения 6-амино-4-галоген-2,1,3-бензоксадиазолов / А.С. Кузнецова, Ю.А. Шупыро // Материалы XV Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – Томск. – 26-29 мая 2014. – С. 133-134.
  21. Талдыкина, Д.С. Синтез производных 2,1,3-бензоксадиазолов, содержащих атом галогена, удаленный от карбоцикла / Д.С. Талдыкина, Ю.А. Шупыро, А.С. Кузнецова // Материалы XV Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – Томск. – 26-29 мая 2014. – С. 155-157.
  22. Шупыро, Ю.А. Синтез некоторых 4-арилокси-6-амино-2,1,3-бензоксадиазолов / Ю.А. Шупыро, Д.С. Талдыкина, А.С. Кузнецова // Материалы XV Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – Томск. – 26-29 мая 2014. – С. 163-164.