

Р. Р. Каюмова<sup>1</sup>, Р. Р. Муслухов<sup>1</sup>, М. Ф. Абдуллин<sup>1</sup>,  
Е. Э. Клен<sup>2</sup>, Ф. А. Халиуллин<sup>2</sup>, Г. Ф. Магадеева<sup>2</sup>,  
А. В. Мамыкин<sup>1\*</sup>, С. Л. Хурсан<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА В РАСТВОРАХ

Обнаружена и исследована хемилюминесценция при окислении 3-бром-5-гидразино-1-(тиетан-3-ил)-1*H*-1,2,4-триазола анионом супероксида. Спектр хемилюминесценции лежит в области 400–590 нм, максимумы которого (около 436 и 540 нм) совпадают с максимумами спектра флуоресценции продуктов реакции. Методами спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии, ИК и УФ спектроскопии определены возможные продукты реакции. Квантовый выход хемилюминесценции составил  $10^{-9}$  Э/моль.

**Ключевые слова:** производные 1,2,4-триазола, супероксид, масс-спектрометрия, флуоресценция, хемилюминесценция.

*N*-Замещённые 1,2,4-триазолы обладают широким спектром фармакологической активности: противогрибковой, антибактериальной, гипотензивной и др. В настоящее время в медицине находят применение в качестве лекарственных препаратов такие производные 1,2,4-триазола, как рибавирин, флуконазол, тразодон [1–3]. Введение в триазольный цикл различных заместителей позволяет расширить возможности 1,2,4-триазолов как с точки зрения появления новых особенностей биологического действия, так и их спектрально-люминесцентных свойств. Нами был синтезирован новый ряд производных 1,2,4-триазола, где в качестве заместителя использовали тиетановый цикл, поскольку тиетансодержащие бензимидазолы и ксантины обладают противовирусными, противомикробными, иммуностропными свойствами [4]. Кроме того, триазолы являются перспективными соединениями для оптоэлектроники [5, 6]. 1,2,4-Триазол применяют также в качестве катализатора хемилюминесценции пероксалатов [7]. Ранее мы приводили результаты исследования люминесцентных свойств тиетансодержащих 1,2,4-триазолов: 3,5-дибром-1-(тиетан-3-ил)-1*H*-1,2,4-триазола, 3-бром-5-гидразино-1-(тиетан-3-ил)-1*H*-1,2,4-триазола (1), 3-бром-5-{2-[1-(4-нитрофенил)этилиден]гидразино}-1-(тиетан-3-ил)-1*H*-1,2,4-триазола, 3-бром-5-{2-[1-(4-нитрофенил)этилиден]гидразино}-1-(1-оксидотиетан-3-ил)-1*H*-1,2,4-триазола, 3-бром-1-(1,1-диоксидотиетан-3-ил)-5-{2-[1-(4-нитрофенил)этилиден]гидразино}-1*H*-1,2,4-триазола [8]. Ввиду наличия таких свойств представляло интерес исследовать хемивозбуждение триазолов в окислительно-восстановительных реакциях. В настоящей работе изучено окисление соединения 1 (рис. 1) супероксид-ионом ( $O_2^{\cdot -}$ ) – важным интермедиатом многих биологических процессов.

Супероксид-ион синтезируется в организме фагоцитами (гранулоцитами и моноцитами крови) а также тканевыми макрофагами [9]. На организм активные формы кислорода, в том числе супероксид, оказывают как положительное (поддерживают окислительно-восстановительный гомеостаз, проявляют антибактериальную активность), так и отрицательное влияние (могут индуцировать клеточное старение и апоптоз) [10].

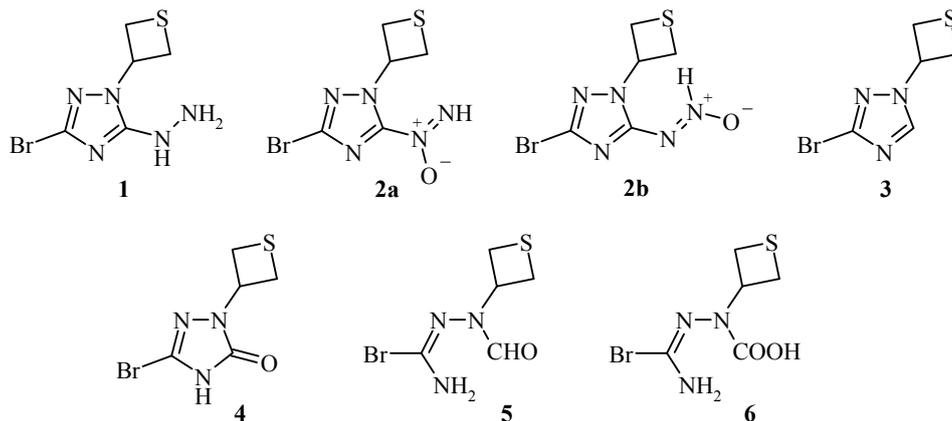


Рис. 1. Структура исследуемого соединения **1** и возможных продуктов окисления **2a,b, 3–6**

**Исследование спектров хемилюминесценции (ХЛ), флуоресценции (ФЛ), возбуждения ФЛ и поглощения.** При смешивании раствора соединения **1** в ДМСО ( $c 10^{-2}$  М) и азрированного щелочного раствора ДМСО, где концентрация супероксид-иона составляет  $3 \cdot 10^{-3}$  М, наблюдается ХЛ. Кинетика ХЛ носит сложный характер: в момент смешивания наблюдается резкий всплеск интенсивности ХЛ и экспоненциальный спад, после индукционного периода (около 2 мин) начинается повторный рост интенсивности ХЛ, которая достигает максимума через 40 с (рис. 2).

Вспышка, которая наблюдается в момент смешивания растворов (около 5 с), может иметь нехимическую природу. Аналогичные вспышки описаны в других работах [11, 12], их связывали со специфическим физическим взаимодействием капель с поверхностным слоем реакционного раствора в момент смешивания.

Спектр ХЛ реакции, представленный на рис. 3 (кривая 3), лежит в области 400–590 нм с двумя максимумами около 436 и 540 нм (получены с помощью интерференционных светофильтров). Этот спектр в основном относится ко второму всплеску интенсивности (150 с от начала реакции), поскольку интенсивность свечения на данном участке во много раз превосходит таковую на начальном участке.

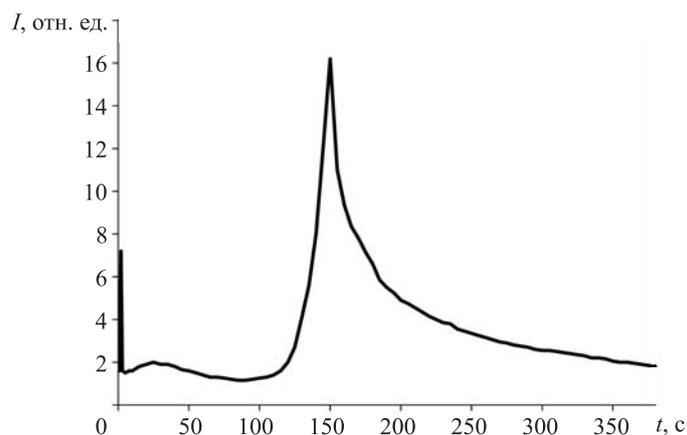


Рис. 2. Изменение интенсивности ХЛ во времени в реакции окисления соединения **1** ( $c 10^{-2}$  М) супероксид-ионом  $O_2^{\cdot -}$  ( $c 3 \cdot 10^{-3}$  М), растворитель ДМСО, 20 °С

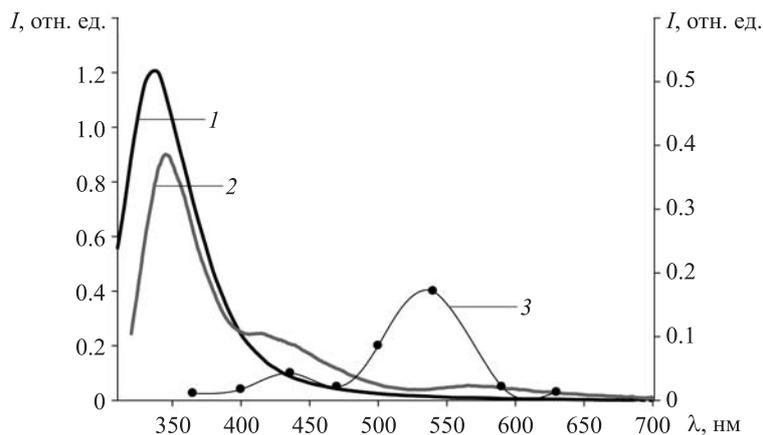


Рис. 3. Спектры ФЛ: 1 – соединения **1** ( $c 10^{-2}$  М), 2 – продуктов окисления при возбуждении на длине волны 270 нм (ширина щелей 10/10 нм), 3 – спектр ХЛ реакции окисления соединения **1** ( $c 10^{-2}$  М) супероксид-ионом  $O_2^{\cdot -}$  ( $c 3 \cdot 10^{-4}$  М), растворитель ДМСО, 20 °С. Кривые 1, 3 соответствуют вертикальной оси слева, кривая 2 – вертикальной оси справа

Для установления источника эмиссии были получены спектры ФЛ соединения **1** в ДМСО (рис. 3, кривая 1) и конечных продуктов реакции (реакционной смеси через 4 ч от начала реакции окисления соединения **1** супероксид-ионом, рис. 3, кривая 2).

По рис. 3 видно, что в спектре 2, в отличие от спектра 1, появляются новые полосы излучения при 435 и 562 нм, которые лежат в той же области, что и спектр ХЛ. Эти данные позволяют предположить, что эмиттерами ХЛ являются не промежуточные, а конечные продукты реакции. Максимум ФЛ при длине волны 338 нм, характерный для триазольного фрагмента, после проведения окисления смещается в длинноволновую область и интенсивность ФЛ уменьшается в 3 раза, что может быть связано с расходом соединения **1** в ходе реакции и/или с трансформацией триазольного цикла.

Изменение интенсивности ХЛ сопровождается изменением спектра поглощения продуктов окисления в ходе реакции. Поэтому были получены спектры поглощения продуктов окисления, образованных в ходе реакции, и спектры возбуждения ФЛ реакционной смеси через 4 ч от начала реакции (рис. 4)

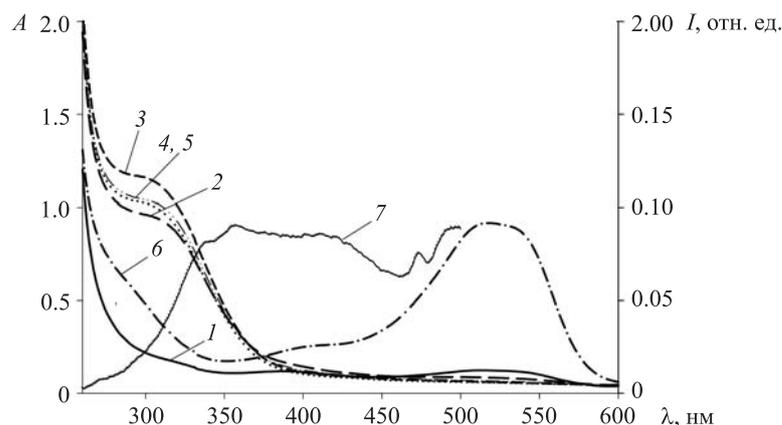


Рис. 4. Спектры поглощения продуктов окисления: 1 – в момент смешивания, 2 – через 2 мин, 3 – через 5 мин, 4 – через 30 мин, 5 – через 1 ч, 6 – через 20 ч, 7 – спектр возбуждения ФЛ продуктов окисления, при возбуждении на длине волны 550 нм (ширина щелей 10/10 нм), растворитель – ДМСО, 20 °С. Кривые 1–6 соответствуют оси А слева, кривая 7 – оси I справа

В спектрах поглощения в ходе окисления появляется новая полоса при 300 нм, интенсивность которой в течение первых 5 мин увеличивается в 5 раз, затем постепенно падает и практически исчезает через несколько часов. Данная полоса поглощения и максимумы ФЛ при 435 нм и ХЛ при 436 нм, вероятно, относятся к интермедиату, содержащему карбонильную группу [13].

В качестве возможного продукта нами был синтезирован 5-бром-2-(тиетан-3-ил)-2,4-дигидро-3*H*-1,2,4-триазол-3-он (**4**) [14]. В спектре поглощения соединения **4** в ДМСО имеется максимум при 300 нм. С целью сопоставления спектров продуктов реакции и модельного соединения **4** было проведено масс-спектрометрическое исследование. Оказалось, что время удерживания образца соединения **4** в эксперименте с использованием ВЭЖХ-МС составляет 3.55 мин и совпадает со временем выхода иона  $[M-H]^-$  с  $m/z$  ( $I_{отн}$ , %) 234 (26) и 236 (20) в образце продуктов окисления. Таким образом, иону  $[M-H]^-$  с  $m/z$  ( $I_{отн}$ , %) 234 (26) и 236 (20) действительно соответствует структура соединения **4**, как по массе, так и по времени удерживания.

Однако мы не можем отнести это соединение к эмиттеру ХЛ в реакции окисления, поскольку спектры поглощения и возбуждения ФЛ соединения **4** лежат в одной области ( $\lambda_{max}$  300 нм), но не совпадают со спектром возбуждения ФЛ реакционной смеси (рис. 4, кривая 7), имеющего максимум 360 нм. Кроме того, спектр ФЛ соединения **4** ( $\lambda_{возб}$  270 нм) имеет максимум 335 нм, но не имеет максимумов в области 400–600 нм (излучение в этой области характерно для продуктов окисления соединения **1**). А окисление соединения **4** в тех же условиях, приводит к появлению новых полос в спектре ФЛ продуктов при 435 и 562 нм. В связи с этим полосы с максимумом 360 нм в спектре возбуждения ФЛ, максимумы ФЛ при 435 нм и ХЛ при 436 нм мы отнесли к другому продукту – соединению **5**.

Кроме того, в спектрах поглощения продуктов реакции появляется новая полоса с максимумом при 520 нм, которая наблюдается и в спектрах возбуждения ФЛ реакционной смеси. Она соответствует как продукту окисления гидразинной группы – соединению **2a** и/или **2b**, которое обуславливает окрашивание раствора в розовый цвет, но не отвечает за ФЛ в длинноволновой области, так и соединению **6** – эмиттеру фотонов, отвечающего за ФЛ при 562 нм.

**Изменения в спектрах ИК, ЯМР  $^{13}C$ ,  $^1H$  и масс-спектрах.** С целью идентификации стабильных продуктов был проведён анализ состава реакционной смеси методами спектроскопии ИК, ЯМР и масс-спектрометрии.

Перед анализом продуктов окисления методом спектроскопии ЯМР проводили концентрирование реакционной смеси отгонкой растворителя. В отличие от спектров ЯМР  $^{13}C$  и  $^1H$  соединения **1** в ДМСО- $d_6$ , в спектре ЯМР  $^{13}C$  продуктов реакции появляются новые сигналы при 145.3 и 157.6 м. д., а в спектре ЯМР  $^1H$  – синглет при 6.49 м. д. и слабопольные уширенные синглеты при 7.82, 8.41, 9.50, 10.04, соответствующие, по-видимому, нестабильным интермедиатам распада гидразиновой группы. Эти данные согласуются с ИК спектрами, в которых в ходе окисления исчезает характеристичная полоса группы  $-NH-NH_2$  ( $\nu$  1581  $cm^{-1}$ ) [15]. Таким образом, в ходе реакции происходит отрыв гидразиновой группы с образованием соединения с незамещённой двойной связью – 3-бром-1-(тиетан-3-ил)-1,2,4-триазола (**3**) (рис. 1). Кроме того, в углеродном спектре продуктов окисления имеются сигналы карбонильной группы при 198.6 м. д. и карбоксильной группы при 168.7 м. д., свидетельствующие об окислении атома С-5 триазольного цикла. Значения химических сдвигов атомов углерода и протонов тиетанового цикла

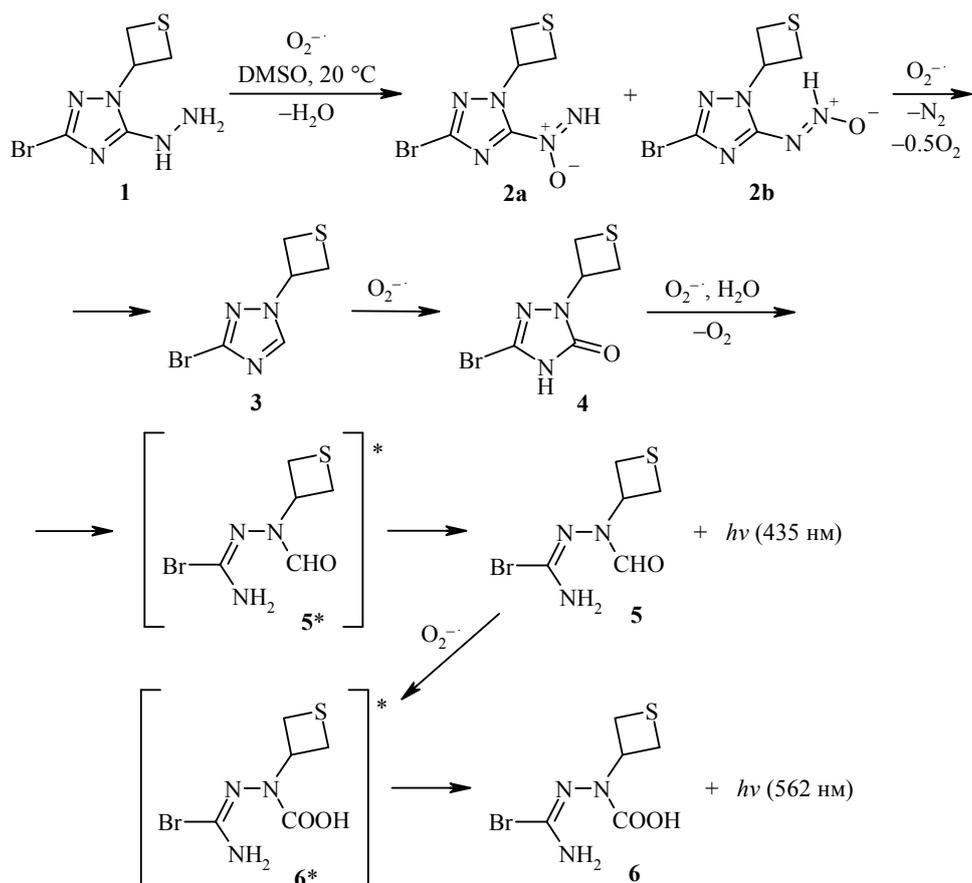
изменяются незначительно, что свидетельствует о том, что в реакции окисления тиетановый цикл не участвует.

Образование иона  $O_2^{\cdot-}$ , согласно работе [16], происходит в реакции ДМСО с КОН, когда в результате отрыва одного протона и переноса электрона к молекулярному кислороду образуется ион  $O_2^{\cdot-}$  и метилсульфонилкарбанион ДМСО с активированной группой  $CH_3$ . Данное предположение подтверждает появление в углеродном спектре ДМСО новых сигналов – продуктов частичного дейтерообмена. Вид новых сигналов указывает на обмен 1–3 протонов в метильных группах ДМСО.

В масс-спектре продуктов окисления соединения **1** пики ионов  $[M-H]^-$  с  $m/z$  ( $I_{отн}$ , %) 262 (74) и 264 (84), 234 (26) и 236 (20), 252 (16) и 254 (6), вероятно, соответствуют структурам соединений **2a, b**, **4**, **6**, представленных на рис. 1.

Для идентификации возможного эмиттера фотонов было проведено разделение реакционной смеси методом ВЭЖХ, используя элюенты гексан–2-PrOH и  $H_2O$ –MeCN. По спектрам ФЛ, люминесцирующий компонент, излучающий в области 420–600 нм с максимумом 565 нм, был обнаружен во фракции, где в качестве элюента использовался гексан–2-PrOH. В масс-спектре данной фракции обнаружены пики ионов  $[M-H]^-$  с  $m/z$  ( $I_{отн}$ , %) 234 (100) и 236 (90), 250 (88) и 252 (100), соответствующие соединениям **4**, **6** (рис. 1).

Исходя из полученных данных, можно предположить следующую схему реакции окисления соединения **1** супероксид-ионом.



ХЛ на начальном участке реакции (5–50 с) можно отнести к стадии окисления гидразинной группы при промежуточном образовании соединений **2a,b**. Далее на участке 50–120 с от начала реакции происходит отрыв гидразиновой группы от триазольного цикла с образованием соединения **3** и последующее присоединение атома кислорода к атому С-5 с образованием соединения **4**. Наиболее интенсивное свечение реакционной смеси через 2 мин после смешивания соответствует, по-видимому, стадии раскрытия триазольного цикла с образованием возбуждённых интермедиатов **5\***, **6\***, спонтанный переход которых в основное состояние и вызывает ХЛ.

Для данной реакции был рассчитан квантовый выход ХЛ, который составил  $10^{-9}$  Э/моль. С учётом квантового выхода излучения соединения **1**, определённого ранее –  $10^{-2}$  Э/моль [8], квантовый выход возбуждения (отношение числа возбуждённых молекул продукта к числу актов химического взаимодействия) составляет  $10^{-7}$ . Низкий квантовый выход возбуждения может быть следствием протекания побочных реакций, приводящих к образованию конечных продуктов безызлучательным путём. Например, возможна конденсация с замыканием цикла в результате взаимодействия карбонильной и аминной групп, или же образование внутренней соли в реакции карбоксильной и аминной групп.

Таким образом, в обнаруженной хемилюминесцентной реакции окисления производного 1,2,4-триазола супероксид-ионом образование электронно-возбуждённых частиц происходит в результате последовательно протекающих реакций, включающих разрыв триазольного цикла.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК спектры зарегистрированы на фурье-спектрометре Bruker Tensor 27 в ДМСО. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  записаны на спектрометре Bruker AM-300 (300 и 75 МГц соответственно) в ДМСО- $d_6$ , внутренний стандарт ТМС. Масс-спектры с ионизацией электрораспылением образцов соединения **1** в ДМСО и продуктов реакции окисления зарегистрированы на квадрупольном жидкостном хромато-масс-спектрометре Shimadzu LCMS-2010 EV (шприцевый ввод, раствор образца в ДМСО– $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{MeCN}$  при расходе 60 мкл/мин, элюент –  $\text{MeCN}$ – $\text{H}_2\text{O}$  95:5) в режиме регистрации отрицательных ионов при потенциале капилляра –3.5 кВ. Температура капилляра интерфейса 250 °С, напряжение на капилляре интерфейса –25 В. Скорость потока распыляющего газа ( $\text{N}_2$ ) 0.8 л/мин. Напряжение на высокочастотных линзах (Q-агау) –5 В. Анализ методом ВЭЖХ проведен на хроматографической системе Shimadzu LC-20 со спектрофотометрическим диодно-матричным детектором. Использована колонка Exsil Silica (250 × 4.6 мм) с фазой Luna C 18, диаметр зерён 5 мкм (Phenomenex, США). Элюирование проведено в изократическом режиме (элюент гексан–2-PrOH 87:13,  $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{MeCN}$  80:20) со скоростью потока 1 мл/мин. Детектирование при длинах волн 254 и 300 нм.

Определение интенсивности ХЛ проведено на установке, состоящей из непроницаемой камеры и детектора – фотоэлектронного умножителя ФЭУ-140, питаемого от высоковольтного стабилизированного выпрямителя БНВ 3–09. Сигнал с ФЭУ поступал на высокоомный вход электронного потенциометра К 201. Спектральная область ХЛ зарегистрирована с помощью интерференционных светофильтров, расположенных между дном стеклянной кюветы и фотокатодом ФЭУ. Светосуммы, определенные с помощью светофильтров, сопоставлены со светосуммой, полученной без светофильтров. Спектры поглощения получены на спектрофотометре Specord M-400 фирмы Carl Zeiss Jena в сантиметровой кювете, раствор сравнения – чистый растворитель. Спектры флуоресценции и возбуждения ФЛ записаны на спектрофлуориметре CM-2203 фирмы Солар (Минск).

**3-Бром-5-гидразино-1-(тиетан-3-ил)-1H-1,2,4-триазол (1)** синтезирован по методике [8]. ИК спектр,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 1581 (NH-NH<sub>2</sub>), 1654 (C=N), 3028, 3142, 3208 (N-H). Данные спектров ЯМР соответствуют литературным. Масс-спектр,  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ , %): 248 [M-H]<sup>-</sup> (87), 328 [M+Br]<sup>-</sup> (17).

**5-Бром-2-(тиетан-3-ил)-2,4-дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-он (4)** синтезирован по методике [14]. Данные спектров ЯМР соответствуют литературным данным. Масс-спектр,  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ , %): 234 [M-H]<sup>-</sup> (100).

**Супероксид-ион (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)** генерируют насыщением кислородом 20 мл раствора КОН в ДМСО ( $c$   $3 \cdot 10^{-3}$  М) в течение 10 мин [16]. Концентрацию супероксид-иона определяют УФ спектроскопией на длине волны 256 нм ( $\epsilon$   $780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [17].

*Работа выполнена при финансовой поддержке ОХНМ РАН (программа ОХ-01). Авторы благодарны ЦКП "Химия" ИОХ УНЦ РАН за регистрацию спектров (ЯМР, ИК, УФ).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва, 2005, т. 1, с. 1200.
2. А. Т. Бурбелло, А. В. Шабров, П. П. Денисенко, *Современные лекарственные средства*, Нева, С.-Петербург, 2006, 3-е изд., с. 896.
3. A. D. M. Curtis, N. Jennings, in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, A. R. Katritzky, C. A. Ramsden, E. F. V. Scriven, R. J. K. Taylor (Eds.), Elsevier, Oxford, 2008, vol. 5, p. 203.
4. В. Л. Русинов, Е. Н. Уломский, О. Н. Чупахин, В. Н. Чарушин, *Изв. АН, Сер. хим.*, 967 (2008). [*Russ. Chem. Bull.*, **57**, 985 (2008).]
5. L.-R. Tsai, Y. Chen, *Macromolecules*, **40**, 2984 (2007).
6. X.-Y. Zhou, Y.-Q. Huang, W.-Y. Sun, *Inorg. Chim. Acta*, **362**, 1399 (2009).
7. T. Jonsson, K. Irgum, *Anal. Chim. Acta*, **400**, 257 (1999).
8. Р. Р. Каюмова, С. С. Остахов, А. В. Мамыкин, Р. Р. Муслухов, Г. Ф. Исхакова, С. П. Иванов, С. А. Мещерякова, Е. Э. Клен, Ф. А. Халиуллин, В. П. Казаков, *Журн. общ. химии*, **81**, 1010 (2011). [*Russ. J. Gen. Chem.*, **81**, 1203 (2011).]
9. J. A. Knight, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **30**, 145 (2000).
10. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44 (2007).
11. Р. Г. Булгаков, С. П. Кулешов, Г. А. Толстиков, В. П. Казаков, *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, 731 (1986).
12. N. Duran, K. Zinner, R. C. De Baptista, C. C. C. Vidigal, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.*, **24**, 383 (1976).
13. Р. Ф. Васильев, А. В. Трофимов, Ю. Б. Цаплев, *Успехи химии*, **79**, 95 (2010).
14. Е. Э. Клен, И. Л. Никитина, А. Г. Гильманова, А. Ф. Мифтахова, О. А. Иванова, Ф. А. Халиуллин, Е. К. Алехин, РФ Пат. 2459818; *Бюлл. изобрет.*, № 24, 7 (2012).
15. А. Гордон, Р. Форд, *Спутник химика*, Мир, Москва, 1976, с. 233.
16. K. Nyland, C. Auclair, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 531 (1981).
17. B. C. Matheson, J. Lee, *Spectrosc. Lett.*, **2**, 117 (1969).

<sup>1</sup> *Институт органической химии УНЦ РАН,  
пр. Октября, 71, Уфа 450054, Россия  
e-mail: chemlum@anrb.ru*

*Поступило 23.01.2014  
После доработки 6.05.2014*

<sup>2</sup> *Башкирский государственный медицинский университет,  
ул. Ленина, 3, Уфа 450000, Россия  
e-mail: khaliullin\_ufa@yahoo.com*