

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н.  
Толстого»  
(ФГБОУ ВПО «ТГПУ им. Л.Н. Толстого»)

Кафедра химии

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ  
РАБОТА**

на тему:

**Исследование биологической активности замещенных пиразинов с  
использованием тест-объектов**

Выполнена: студенткой 5 курса группы ХБ  
очной формы обучения  
специальности «Химия и Биология»  
факультета естественных наук  
Воскобой Лидией Сергеевной

Тула – 2014

Работа выполнена на факультете естественных наук ТГПУ  
им. Л. Н. Толстого

Научный руководитель – Блохин Игорь Васильевич, кандидат химических наук, доцент

\_\_\_\_\_ Блохин И.В.

Работа допущена к защите  
Заведующий кафедрой химии

\_\_\_\_\_ Атрощенко Ю. М.

Рецензент

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ 2014 г. в учебном корпусе №2 Тульского государственного педагогического университета им. Л. Н. Толстого ауд \_\_\_\_ в \_\_\_\_ ч.

Декан естественнонаучного факультета

« » \_\_\_\_\_ 2014 г.

\_\_\_\_\_ Шахкельдян И. В.

## Содержание:

<b>1. Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Литературный обзор.....</b>	<b>6</b>
2.1. Исторический обзор.....	6
2.2. Нахождение в природе и применение.....	8
2.3. Строение и физические свойства пиразина.....	9
2.4. Методы синтеза пиразина.....	11
2.5. Химические свойства пиразина.....	17
<b>3. Обсуждение результатов.....</b>	<b>23</b>
3.1. Исследование биологической активности производных пиразина, как стимуляторов роста.....	23
3.2. Компьютерная оценка спектра биологической активности замещенных пиразина.....	27
<b>4. Экспериментальная часть.....</b>	<b>31</b>
4.1. Методика синтеза 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой и синтеза 1-(3-((п-толил)тио)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислот.....	31
4.2. Приготовление растворов.....	32
4.3. Методика ВИР. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям.....	32
<b>5. Выводы.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Список использованной литературы.....</b>	<b>34</b>

## 1. Введение

Химия гетероциклических соединений привлекает внимание большого числа исследователей. Такое внимание обусловлено широкими областями применения гетероциклических соединений: они преобладают среди лекарственных препаратов, а также средств, используемых в сельском хозяйстве и ветеринарии. Они находят применение как гербициды, оптические отбеливатели, антиоксиданты, ингибиторы коррозии и разнообразные присадки. Многие красители и пигменты имеют гетероциклическую природу.

Гетероциклические соединения широко применяются в качестве промежуточных соединений в органическом синтезе. Поэтому огромное число исследовательских работ посвящено методам синтеза и изучению свойств гетероциклических соединений.

Быстрое развитие органической химии обеспечивается практическими потребностями общества. Одной из таких потребностей является наличие арсенала доступных, надежных и эффективных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний человека. Эту прикладную задачу решает огромная армия химиков-органиков, работающая в тесном сотрудничестве со специалистами в области фармацевтической химии, биохимии, фармакологии, медицины, а также со специалистами по химической технологии. Роль гетероциклических соединений в процессах жизнедеятельности растительных и животных организмов исключительно велика [1].

Особый интерес представляет пиразиновая структура, которая входит в состав ряда важных природных веществ, например рибофлавина, фолиевой кислоты и др. Производные пиразина нашли применение в качестве синтетических лекарственных средств, среди них бактериостатические препараты: сульфапиразин и сульфометопиразин, антигельминтное

лекарство – дитразин, антигистаминный препарат – хлорциклизин, диуретик – амилорид, противотуберкулезный препарат – пипразинамид и др. [2].

В связи с этим, основная цель моей работы:

- ✓ Установить зависимость «структура – свойства» на основе данных компьютерного скрининга и биологических испытаний замещенных пипразинов с использованием тест-объектов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

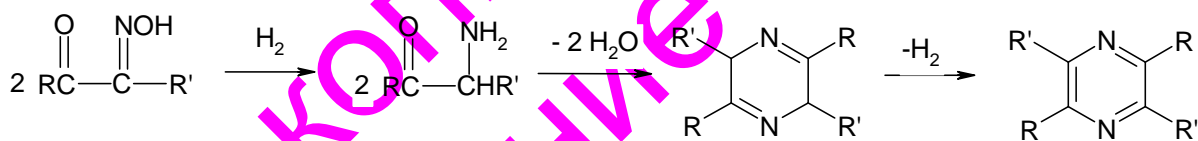
- 1) провести биологическое тестирование данных замещенных пипразинов;
- 2) сравнить влияние растворов исследуемых веществ на рост и развитие тест-объектов;
- 3) провести компьютерное моделирование с помощью системы Pass замещенных пипразинов;
- 4) на основании полученных данных системы Pass дать первоначальную оценку биологической активности исследуемых веществ;

Использование в научных и учебных целях

## 2. Литературный обзор

### 2.1. Исторический обзор

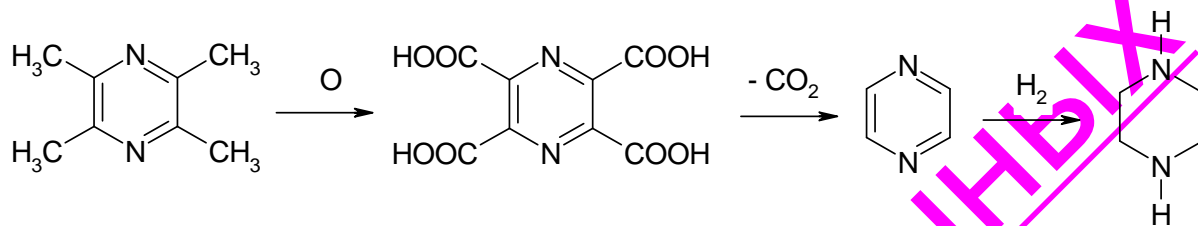
Получение «амарона» Лаурентом в 1844 г. является первым зарегистрированным синтезом пиразина. Метод Лаурента, однако, остался неясным, и лишь спустя более пятидесяти лет «амарон» был идентифицирован как тетрафенилпиразин. Тем временем этот ряд соединений систематически начали изучать Гуткнехт и Трэдвелл – ученики В. Мейера, которые нашли, что при восстановлении нитрозированных кетонов вместо ожидаемых  $\alpha$ -аминокетонов образуются не содержащие кислорода основания [3]. Теперь известно, что это превращение можно представить следующим образом:



Правильная структура циклической системы продуктов реакции впервые была предложена Влюгелем; синтез производных пиразина, проведенный другим методом подтвердил эту структуру и позволил установить истинное положение заместителей. Наконец, осуществленное Вольфом в 1893 г. превращение тетраметилпиразина в пиперазин рядом дало однозначное доказательство структуры пиразинов [4].

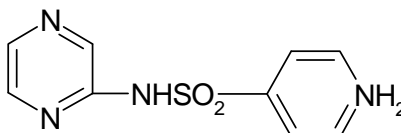
Образование пиразина из  $\alpha$ -аминокетона должно сопровождаться отщеплением водорода и воды. Габриэль и Пинкус установили, что выходы получаются значительно более высокими, если окислитель добавляется к реакционной смеси после того, как закончилась конденсация. Габриэль доказал промежуточное образование дигидропиразинов выделением этих

соединений в условиях отсутствия воздуха и последующим окислением их до соответствующих пиразинов.



На основании молекулярных рефракций различных производных Брюль установил, что структура пиразинового кольца скорее относится к типу структур Кекуле, чем к типу структур Дьюара.

Вследствие недостатка в природных источниках пиразина и его производных эти соединения прежде были сравнительно дорогостоящими. До последнего времени они не находили никакого важного применения, и после опубликования первых работ по химии пиразина этим соединениям уделялось мало внимания. Когда успехи химиотерапии открыли новые возможности применения этих малодоступных веществ, то снова возник интерес к пиразинам. Гидразиды пиразинмонокарбоновой кислоты были запатентованы в качестве укрепляющих средств [5], а то, что пиразинкарбоновые кислоты оказались эффективными при лечении пеллагры, показывает, что физиологическое действие некоторых пиразинов подобно действию соответствующих пиридинов. После открытия превосходных бактериостатических свойств сульфапиразина (IV) и некоторых его производных началось широкое использование сульфамидных препаратов, которое привело также к общему оживлению в исследовании пиразинов [6].

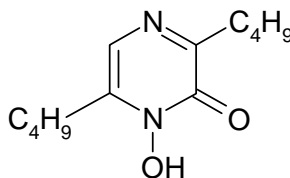


IV

С этого времени стали разрабатывать новые и более экономичные методы синтеза пиразинов. Следует ожидать, что возросшая доступность этих соединений привлечет большее внимание к возможностям их использования как для фундаментальных исследований, так и для практического применения. Присутствие пиразиновых ядер в некоторых биологически важных природных продуктах должно было дать дальнейший толчок в этом направлении. Было найдено, что пиразинамид активен против возбудителя туберкулеза и что некоторые сложные эфиры тиолпиразинкарбоновых кислот также проявляют антибактериальные свойства [7].

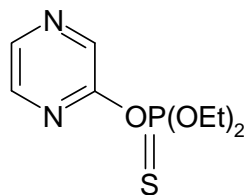
## 2.2. Нахождение в природе и применение

Пиразин и его производные обладают гербицидной и антибиотической активностью. Алкилпиразины – слагаемые аромата пищи, образующегося при ее приготовлении; обнаружены в жареном мясе, картофеле, горохе, перце, какао, кофе, некоторых сырах, используются в качестве вкусовых и душистых веществ. Пиразиновый цикл входит в состав некоторых природных веществ: феромонов, антибиотиков (аспергилловая кислота) [8]

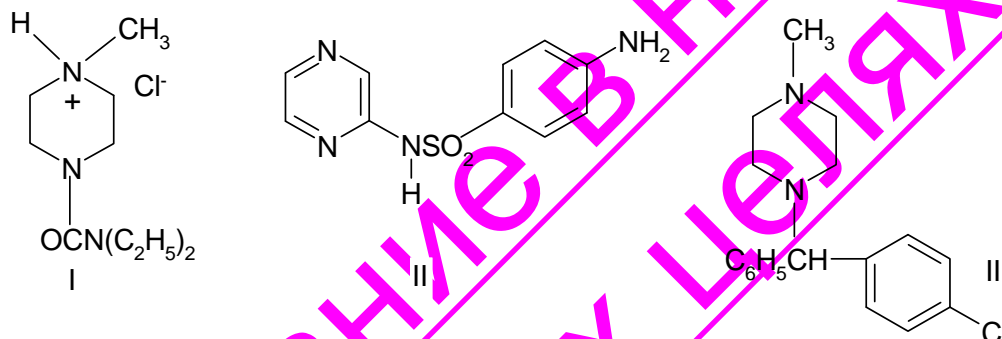


Примером производного пиразина, выпускаемого в промышленности, может служить инсектицид тионазин



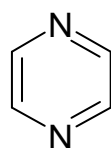


Пиразины также имеют значение как синтетические лекарственные вещества, например, бактериостатическое средство сульфациназол (I), антигельминтное средство дитразин (II), антигистаминный препарат хлорциклизин (III) [9].



Пиразины также используют в качестве противовирусных, антибактериальных, противоопухолевых (эхиномицин) препаратов, азиновых красителей [8]. В настоящее время производные пиразина широко используются в качестве субстрата для синтеза биологически активных веществ, таких как апоптотические ингибиторы протеазы [10], ингибиторы некоторых ферментов фосфорилаз [11] и ВИЧ-специфической обратной транскриптазы [12].

### 2.3. Строение и физические свойства пиразина



Mr, г/моль	80,1
------------	------

Т пл.	540°C
Т кип.	115,5-15,8°C
Плотн, г/см <sup>3</sup>	1,0311
pKa <sub>1</sub>	0,65
pKa <sub>2</sub>	5,80

Пиразин и его производные – бесцветные вещества, хорошо растворимые в воде, хуже – в этаноле, диэтиловом эфире [8]. Пиразин – твердое вещество с низкой температурой плавления, а большинство его низших гомологов – жидкости при комнатной температуре. Пиразины в целом обладают наркотическим запахом, легко возгоняются и могут быть перегнаны с паром. Подобно многим другим аминам, пиразины образуют гидраты и по удалении из последних гидратной воды нагреванием или с помощью дегидратирующих средств часто получают гигроскопичные вещества. Низшие члены ряда прекрасно растворимы в воде, а некоторые смешиваются с ней во всех отношениях [13].

Производные с группами C=O и N–H образуют прочные межмолекулярные водородные связи, что повышает температуру плавления и понижает растворимость.

Эти соединения являются аналогами пиридина и бензола, молекулы стабилизированы в результате циклической делокализации  $6\pi$  – электронов. Так как пиразины содержат два атома азота, имеются две неподеленные пары электронов.

Рентгеноструктурный анализ показывает, что молекула плоская; длины связей C–C и C–N близки к таковым в бензоле, длина связи C–N 0,134, C–C 0,139 нм [14].

Пиразины – ароматические соединения, однако значения энергии резонанса для этих структур ниже, чем для бензола. По химическим

свойствам они в большей степени отличаются от бензола, чем пиридин. Увеличение числа атомов азота в цикле (до 2-ух) приводит к понижению энергии  $\pi$ -молекулярных орбиталей. Таким образом, увеличение числа атомов азота в молекуле затрудняет электрофильную атаку, но способствует атаке нуклеофилами.

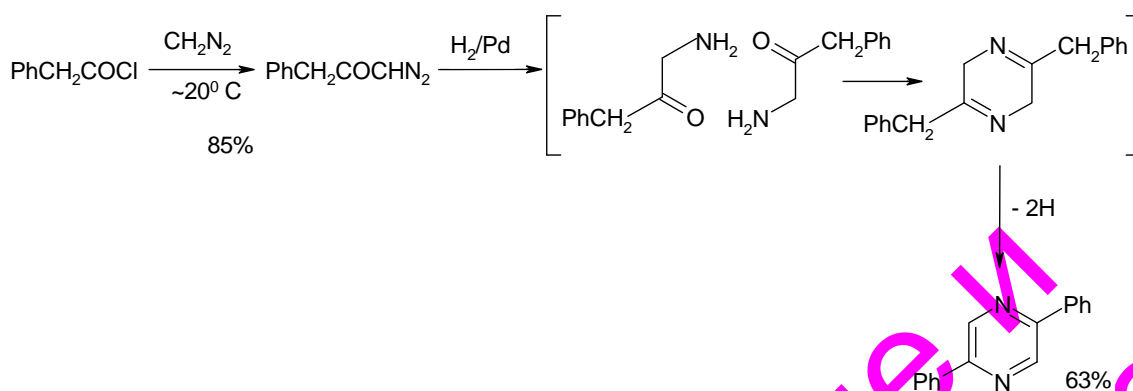
Все атомы углерода в молекулах пиразинов расположены в орто- или пара-положениях по отношению к одному из атомов азота кольца. Интермедиаты, образующиеся при присоединении нуклеофилов к этим атомам углерода, а также при депротонировании алкильных заместителей в этих положениях, резонансно стабилизированы с участием гетероатомов. Это обуславливает селективное активирование определенных атомов углерода в кольце.

Катионы, образующиеся при электрофильной атаке по атому азота, менее стабильны, чем соответствующие катионы пиридиния. Вследствие этого пиразины труднее образуют четвертичные соли, N-оксиды и в меньшей степени проявляют основные свойства, чем пиридины [13].

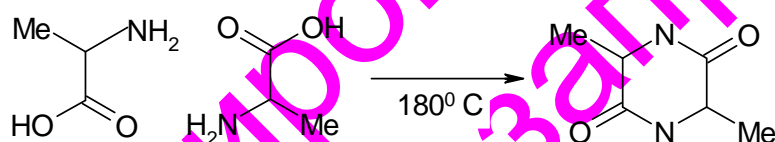
#### 2.4. Методы синтеза пиразина

Известны два основных метода построения пиразинового кольца:

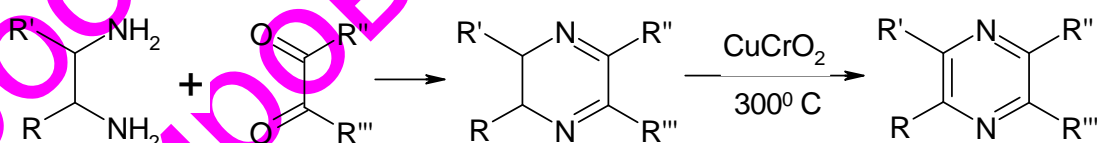
**а) Из  $\alpha$ -аминокарбонильных соединений.** Симметрично замещенные пиразины получают самопроизвольной димеризацией  $\alpha$ -аминокетонов или альдегидов. Аминокарбонильные предшественники устойчивы только в форме солей. Их синтезируют разными способами; один из них приведен ниже. Полученные этим способом дигидропиразины очень легко дегидрируются – для этого часто достаточно перегонки, во время которой происходит диспропорционирование.



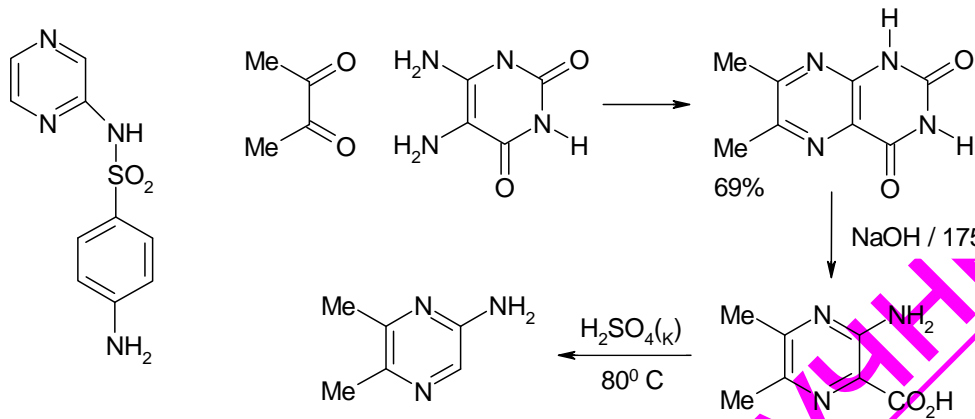
Эфиры  $\alpha$ -аминокарбоновых кислот легко димеризуются в 2,5-ди-кетопиперазины — соединения, устойчивые и не склонные к диспропорционированию [15].



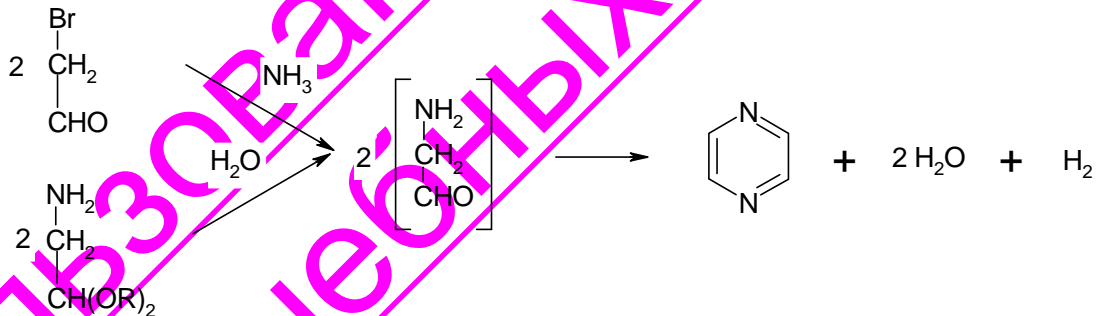
**б) Из 1,2-дикарбонильных и 1,2-диаминосоединений.** По этому общему методу пиразинное кольцо синтезируют конденсацией 1,2-дикарбонильных соединений с соответствующими диаминами. Метод включает последующее дегидрирование продуктов реакции [8].



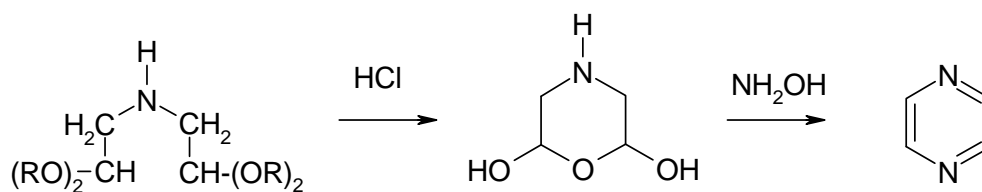
Многие производные 2-аминопиразина были синтезированы для биологических целей. Из них 2-сульфамидопиразин (сульфамидопиразин) известен как средство с мощным бактериостатическим действием. Для синтеза многих соединений такого типа применяется довольно простой вариант общего метода построения пиразинного кольца. При этом в качестве диаминового компонента используется 5,6-диамино-(1H, 3H)-пиримидин-2,4. 2-Аминопиразин образуется в результате размыкания пиримидинового кольца в процессе гидролиза продукта реакции [15].



Классический метод получения пиразинов, т. е. конденсация  $\alpha$ -аминокарбонильных соединений самих на себя, малопригоден для синтеза родоначального члена ряда. Необходимое для этого аминокарбонильное соединение –  $\alpha$ -аминоацетальдегид – склонно давать различные побочные реакции, и по этой причине аминирование бромацетальдегида и гидролиз аминокетала приводят лишь к очень низким выходам пиразина [16].



Пиразин был получен также обходным путем – декарбоксилированием пиразинкарбоновых кислот [4]. Однако в течение многих лет самым продуктивным методом синтеза пиразина был метод Вольфа и Марбурга из ацетала иминодиацетальдегида [17]. При обработке последнего соединения соляной кислотой ацетальные связи разрываются, и образуется 2,6-диоксиморфолин. Это производное морфолина реагирует с гидроксиламином, давая пиразин.



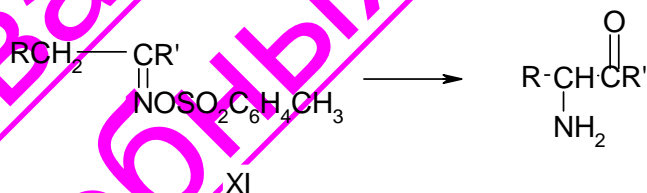
Пиразин получается с 78%-ным выходом непосредственно из ацетала при обработке последнего солянокислым гидроксиламином. Главный недостаток этого метода синтеза заключается в том, что исходное вещество представляет собой труднодоступное соединение [13]. Более современные патенты были приняты для промышленных методов получения пиразина. Это продолжительные процессы, включающие высокотемпературные реакции в паровой фазе над подходящими катализаторами.

На ранних этапах главное внимание в химии пиразина было уделено получению и изучению пиразинов с идентичными углеводородными заместителями в 2,5- и 2,3,5,6-положениях, так как эти соединения составляют наиболее легко доступный класс производных,  $\alpha$ -аминокарбонильные соединения, будучи в растворе в свободном состоянии, самопроизвольно конденсируются в дигидропиразины, которые затем окисляются до соответствующих пиразинов. К числу обычных окислителей относятся хлорная ртуть, перекись водорода и воздух [18]. Часто превращение дигидропиразина в пиразин происходит настолько легко, что промежуточное дигидросоединение не может быть выделено.

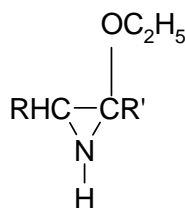
Одним из наиболее широко применяемых методов получения необходимых  $\alpha$ -аминокетонов является восстановление соответствующих оксиминокетонов, которые в свою очередь получают нитрозированием кетонов. Старая методика восстановления, использующая хлористое олово в соляной кислоте, дает аминокетон в виде соли. В процессе выделения основания действием щелочи образуется дигидропиразин. Другими обычными восстановителями оксиминокетонов и пиразины являются цинк и

щелочь, цинк и уксусная кислота и амальгама алюминия. Электролитическое восстановление оксимиацетона дает лишь ничтожные выходы 2,5-диметилпиразина [19]. Попытки получить  $\alpha$ -аминоспиты каталитическим восстановлением соответствующих  $\alpha$ -оксиминокетонов иногда приводят к образованию дигидропиразинов. Промежуточным продуктом по крайней мере некоторых из этих реакций может быть скорее иминоспирт, чем аминокетон, так как каталитическое гидрирование бензоиноксида также дает небольшие количества производных пиразина. Восстановление диоксимов приводит в некоторых случаях к производным пиразина, которые образуются через оксиминокетоны [20].

Простые монооксимы могут быть превращены в  $\alpha$ -аминокетоны или пиразины путем необычной перегруппировки их сложных эфиров с *n*-толуолсульфокислотой (XI), которая происходит под действием этилата калия.

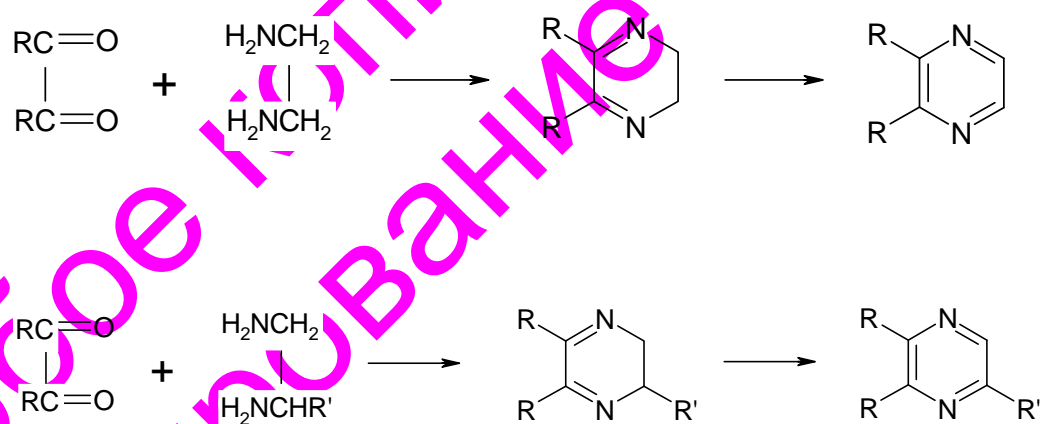


При этом можно либо выделить соль аминокетона, либо получить непосредственно пиразин или дигидропиразин. Тщательное изучение механизма показывает, что в этой реакции образуются промежуточные циклические соединения, такие, как нестойкие производные этоксиэтиленимина.



Хотя симметричные пиразины были получены непосредственным взаимодействием  $\alpha$ -галогенированных карбонильных соединений с аммиаком, применимость этого метода сильно ограничивается различными побочными реакциями. Более четкий фталимидный метод синтеза аминов в общем случае применим и для получения аминокетонов и является поэтому предпочтительным [21].

2,3-Дизамещенные пиразины могут быть получены реакцией 1,2-диаминов с 1,2-дикетонами с последующей дегидрогенизацией образовавшихся дигидропроизводных при нагревании. Если заместители ароматические, то конденсация происходит гладко и с хорошим выходом. В случае применения вышеуказанной реакции к С-замещенным этилендиаминам могут быть получены некоторые три- и тетразамещенные пиразины [22].



Триметилпиразин получается с очень низким выходом вместе с тетраметилпиразином при нагревании бромметилата 2,5-диметилпиразина до 270—280°.

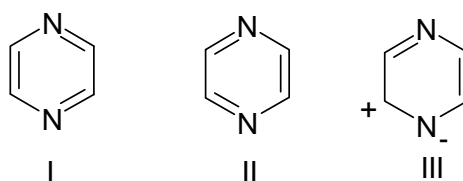
Имеется мало работ, посвященных получению моноалкилпиразинов. Метилпиразин был выделен из смеси продуктов, полученных при нагревании глюкозы с водным аммиаком, а также получен декарбоксилированием 5-метилпиразинкарбоновой-2 кислоты, которая образуется при окислении 2,5-диметилпиразина. С тех пор был описан один улучшенный метод синтеза



метилпиразина. Основанный на методе синтеза самого пиразина, этот метод заключается в дегидрогенизации 2-метилпиперазина в паровой фазе над хромитом меди [23]. Около 40% метилпиперазина превращается в метилпиразин и выход составляет приблизительно 50%.

## 2.5. Химические свойства

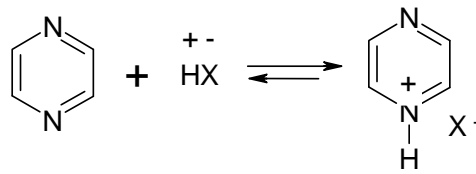
Пиразины являются ароматическими соединениями, а также третичными аминами, и их свойства очень напоминают свойства пиридинов. Пиразиновое ядро можно рассматривать как резонансный гибрид, две из налагающихся структур которого (I и II) аналогичны структурам бензола. Это подтверждается тем [24], что фотографии дифракции электронов



для бензола, пиридина и пиразина весьма сходны. Длины связей С–С в этих трех соединениях имеют ожидаемое значение, соответствующее 50% двоевязности. Длины связей С–N в пиридине и пиразине, однако, несколько больше вследствие высокой электроотрицательности атома азота, которая, вероятно, приводит к заметному участию в резонансе дополнительных структур, таких, как структура III.

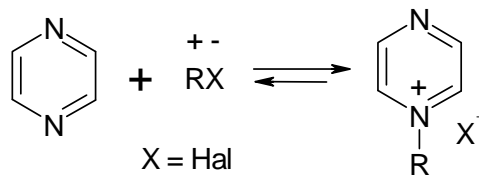
Следует ожидать, что электроотрицательность двух атомов азота будет иметь определенное влияние как на основные, так и на ароматические свойства пиразинов [13].

**Реакции, свойственные третичным аминам.** Пиразин значительно более слабое основание, чем пиридин. Так выражается электроноакцепторное действие второго атома азота:



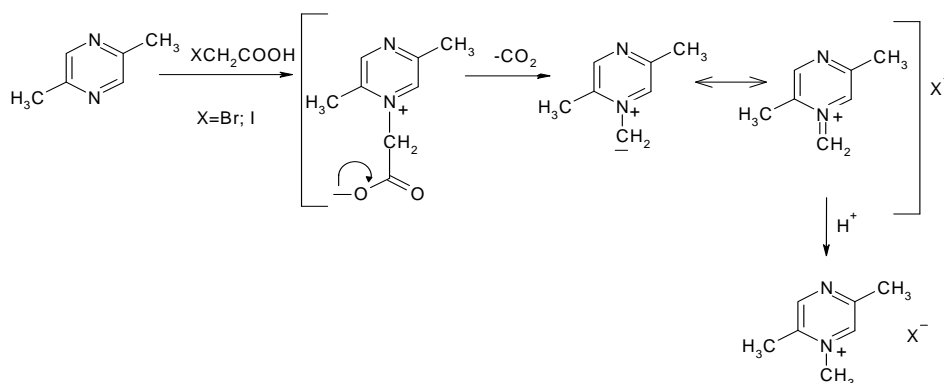
Протонирование второго атома азота возможно только в концентрированных растворах кислот [15].

Хотя обычно пиразины ведут себя как однокислотные основания [25], в условиях отсутствия воды они могут образовывать соли с двумя молекулами кислоты. В безводной среде были получены дигидрохлориды, дигидробромиды и дисульфаты некоторых арилзамещенных пиразинов. При обработке алкилгалогенидами пиразины образуют моночетвертичные соли до некоторой степени труднее, чем пиридины. Выходы и скорости реакции сильно зависят от природы алкилирующего агента [26]. Четвертичные соли бывают иногда неустойчивыми и лучше всего получаются при температурах

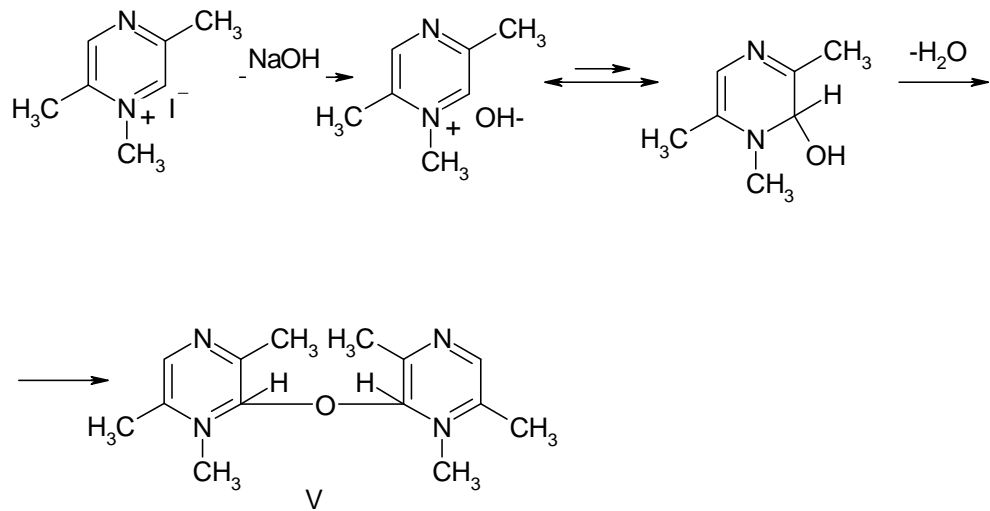


ниже 40°.

Реакция 2,5-диметилпиразина с йод- или бромуксусной кислотой заслуживает внимания. Продуктом этой реакции является соль 1,2,5-триметилпиразина. Промежуточно образующиеся пиразинийуксусные кислоты не могут быть выделены. Предполагаемое течение реакции отображено в следующих формулах [27]:



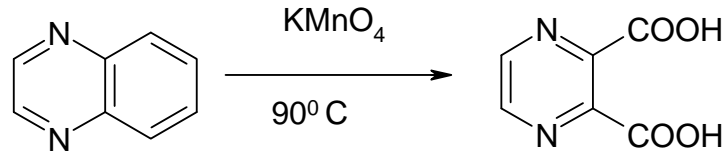
В ряду пиридина четвертичные соли  $\alpha$ - и  $\gamma$ -пиколинов дают ангидрооснования, а соли, не содержащие метильной или метиленовой групп в  $\alpha$ - или  $\gamma$ -положении, при обработке щелочью образуют небольшие количества псевдооснований.



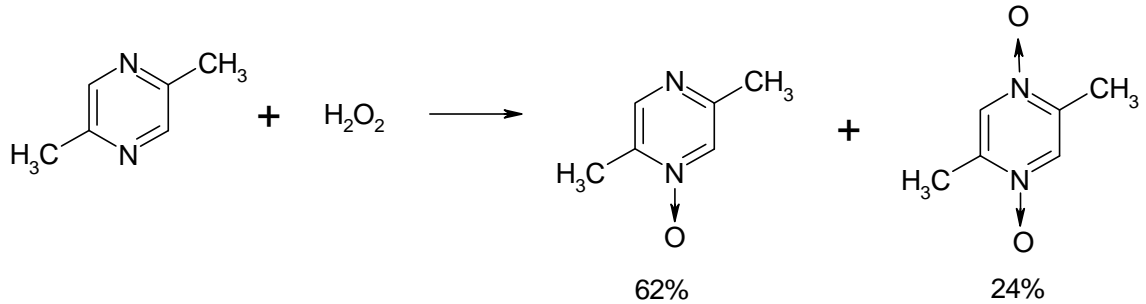
В ряду пиразина, за исключением дигидропроизводных, результаты менее определены. Астон [28] исследовал действие щелочи на йодметилат 2,5-диметилпиразина. Хотя продукт этой реакции слишком неустойчив, чтобы быть выделенным, кинетические исследования показывают, что сначала образуется псевдооснование IV, которое претерпевает самоэтерификацию, давая соединение V (см. схему выше).

Характерным свойством третичных аминов, проявляемым пиразинами, является образование N-окисей при действии на них перекисей (см. ниже).

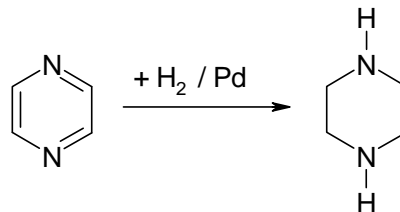
**Окисление.** К действию окислителей пиразин менее устойчив, чем пиридин, и обесцвечивает щелочной раствор перманганата на холоду. Пиразинкарбоновые кислоты хотя и могут быть получены окислением алкильных боковых цепей, но выходы при этом обычно бывают ничтожны. В хиноксалинах пиразиновый цикл несколько более устойчив, чем бензольный, и превращение хиноксалина в пиразиндикарбоновую-2,3 кислоту происходит гладко и с хорошим выходом [29].



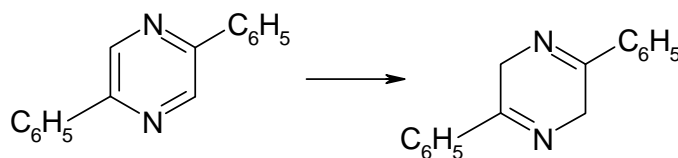
Алкилпирозины реагируют с перекисью водорода, давая смесь моно- и ди-N-окисей [30].  $90^{\circ}\text{C}$



**Восстановление.** Пирозины легко восстанавливаются до насыщенных пиперазинов натрием в спирте, амальгамой алюминия, амальгамой натрия или оловом в соляной кислоте. С успехом применялись также методы каталитического гидрирования [31].

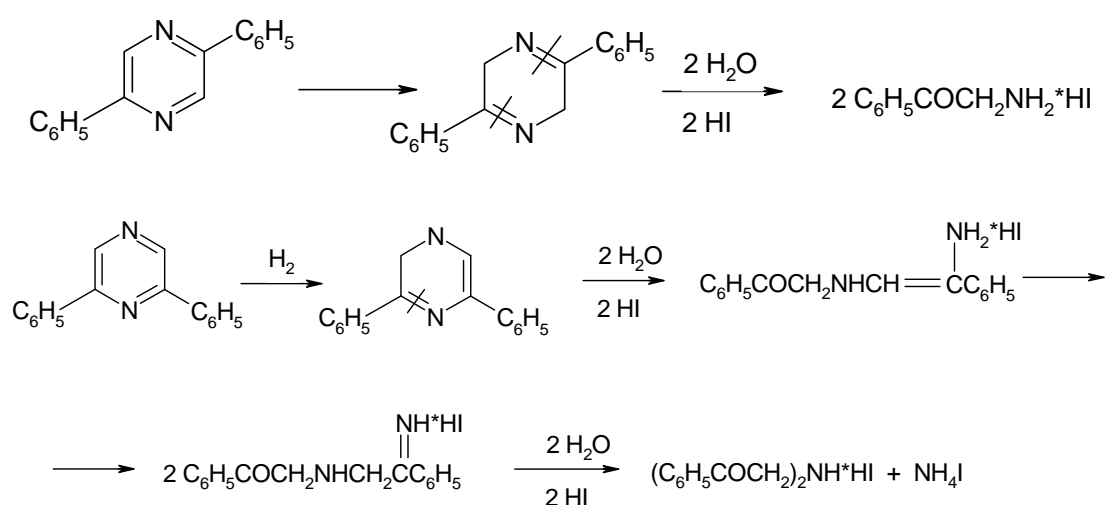


При восстановлении 2,5-ди-фенилпирозина или его окси- или цианпроизводных йодистоводородной кислотой и красным фосфором получается 2,5-дифенил-3,6-дигидропирозин [32].



**Размыкание цикла.** Хотя пирозины в общем устойчивы к щелочам и кислотам, опыты с некоторыми арилпроизводными показывают, что

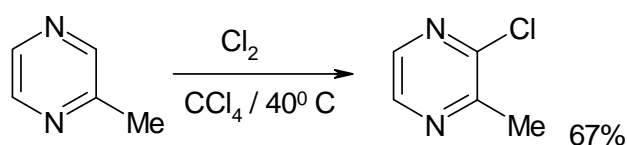
йодистоводородная кислота может расщепить пиразиновое ядро [33]. По-видимому, этот реагент сначала восстанавливает пиразин до дигидропроизводного, которое легко гидролизуется. Тип получаемых продуктов реакции зависит от положения заместителей. 2,5-Дифенилпиразин дает ω-аминоацетофенон, а 2,6-дифенилпиразин—дифенациламин. Механизмы этих реакций не были изучены, но следующий ряд превращений был бы возможен:



**Реакции замещения и присоединения.** Обычно рассматриваемые реакции замещения, которые особенно важны в ряду бензола, включают галогенирование, нитрование, сульфирование и синтез Фриделя — Крафтса. При попытках применить эти реакции к пиразинам встретились с серьезными трудностями, и только в последние годы некоторые из этих попыток увенчались успехом. Как и в ряду пиридина, то, что ароматическое замещение протекает с большим трудом, может быть лучше всего объяснено тем, что подобные реакции проводятся в кислой среде. Сильный положительный полюс, возникающий в ядре при образовании соли, весьма препятствует введению электрофильных групп.

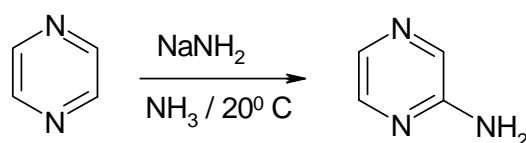
Ряд исследователей наблюдали реакции между производными пиразина и галогенами при комнатной температуре, но продукты этих

реакций, которые они описывали как «перйодиды» или «неустойчивые продукты присоединения брома», не являются, по-видимому, простыми продуктами замещения [25]. Прямое галогенирование пиразина является более современным достижением и представляет один из немногих достоверных примеров взаимодействия производных пиразина с электрофильными агентами.



Гидроксильная группа в оксипиразине оказывает, очевидно, активирующее действие. В то время как арилпиразины нитруются в фенильные группы, нитрование 2-окси-5,6-дифенилпиразина в уксусной кислоте дает 2-окси-3-нитро-5,6-дифенилпиразин [34]. Строение нитросоединения было доказано восстановлением его до амина и сравнением последнего с амином, полученным гофмановской перегруппировкой амида 2-окси-5,6-дифенилпиразинкарбоновой-3 кислоты. Нитрование 2-окси-3,6-дифенилпиразина происходит неопределенно, — отчасти в фенильные группы и, по-видимому, частично в пиразиновое ядро.

Аминирование пиразина и его производных амидом натрия является реакцией, которая демонстрирует восприимчивость ядра пиразина к атакам нуклеофильных реагентов. Для пиразина характерна реакция Чичибарина: [14]



### 3. Обсуждение результатов

#### 3.1. Исследование биологической активности производных пиразина, как стимулятор роста

Для исследования биологической активности в качестве тест-объектов были выбраны семена подсолнечника и кресс-салата. Эти растения из семейств Крестоцветных (кресс-салат) и Астровых (подсолнечник) обладают достаточно быстрыми сроками прорастания и всхожести.

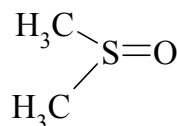
За регуляцию роста и развития растений (в большей степени) отвечают ауксины и цитокинины. Ауксины синтезируются в апексе побега, цитокинины – на кончике корня.

Однако активное внимание ученых к синтетическим регуляторам роста и развития растений можно объяснить рядом недостатков, их природных аналогов. Основными и существенными их недостатками являются [35]:

- ✓ быстрое разложение ауксинов на свету;
- ✓ высокие концентрации, используемые при обработке;
- ✓ высокая стоимость;
- ✓ известно, что если цитокинины попадают в растения в сверх-оптимальных концентрациях, то угнетают их рост и развитие, действуют как ингибиторы (или гербициды). Такое явление вызвано передозировкой гормонального активного компонента, что не может быть безопасным для растения. В связи с этим возникла необходимость поиска новых синтетических аналогов регуляторов роста и развития растений.

Исходя из выше сказанного, в моей работе было особое внимание уделено не просто фиксированию длины ростков в целом, а отдельно прослеживались рост и развитие корешков и побегов тест-объектов в растворах разных концентраций каждого из веществ.

Исследуемые производные пиразинов – белые кристаллические вещества, не растворимы в воде. Поэтому для приготовления растворов, используемых мною в опыте по проверке биологической активности был использован диметилсульфоксид (ДМСО) в качестве растворителя:



Исследование проводили по методике Всероссийского института растениеводства города Санкт-Петербург [36].

Длительность эксперимента – неделя, результаты фиксировались на третьи, пятые и седьмые сутки.

По окончанию эксперимента все полученные результаты были обработаны, а средние значения внесены в таблицу 1.

Таблица 1. Рост и развитие проростков подсолнечника и кресс-салата в растворах исследуемых веществ

Соединение	Концентрация (моль/л)	Семена подсолнечника					Семена кресс-салата				
		Всхожесть (3 сут.) (%)	Выживаемость (7 сут.) (%)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина ростка (см)	Всхожесть (3 сут.) (%)	Выживаемость (7 сут.) (%)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина ростка (см)
1	$3 \cdot 10^{-3}$	80	25	1,5	0,7	2,2	100	0	0	1,4	1,4
	$3 \cdot 10^{-4}$	100	50	1,7	1,9	3,6	100	55	1,5	3,1	4,6
	$3 \cdot 10^{-5}$	90	88	1,8	2,9	4,7	100	70	2,9	4,3	7,2
2	$3 \cdot 10^{-3}$	100	10	0	1,0	1,0	100	0	0	1,6	1,6
	$3 \cdot 10^{-4}$	100	20	3,1	2,9	6,0	100	65	4,1	4,0	8,1
	$3 \cdot 10^{-5}$	90	89	3,2	3,1	6,3	100	95	4,3	4,5	8,8
Контроль	–	80	70	2,8	3,0	5,8	100	90	2,0	3,1	5,1



Как видно из данных таблицы 1 по всем сравниваемым критериям (всхожесть, выживаемость, средние длины корешков, побегов и ростков в целом) по мере снижения концентрации веществ (как первого, так и второго), показатели в большинстве своем возрастают.

Если говорить отдельно о данных, которые были получены в растворах 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислоты, то для семян подсолнечника кроме таких критериев, как всхожесть и выживаемость (в наименьшей концентрации веществ –  $3 \cdot 10^{-5}$  моль/л) значения остальных критериев ниже значений контроля, в то время как для семян кресс-салата значения (опять же таки в наименьшей концентрации) выше, чем у контроля.

В случае 1-(3-((п-толил)тио)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислоты наблюдается разница в значениях уже при средней из мною взятых концентраций ( $3 \cdot 10^{-4}$  моль/л), причем эта разница положительная (значения больше значений контроля) как для семян подсолнечника, так и для семян кресс-салата.

Для сравнения действия веществ разных концентраций на тест-объекты между собой была создана диаграмма 1.

Диаграмма 1. Зависимость длины ростков от концентрации веществ (7 сут.)



Из диаграммы видно, что в наибольшей концентрации лучшие результаты показывает 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-

карбоновая кислота, а в остальных – 1-(3-((п-толил)тио)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновая кислота. Но если соединения сравнивать не только между собой, но и с контролем, то лучшие результаты в средней и наименьшей концентрациях по двум тест-объектам показывает 1-(3-((п-толил)тио)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновая кислота.

Хочу отметить, тот факт, что на третьи сутки (когда фиксировалась всхожесть), семена, как кресс-салата, так и подсолнечника, находящиеся в наибольших концентрациях обоих веществ показали результаты равные контролю, а местами и выше, чем у семян, находящихся в контрольном растворе. По мере хода эксперимента, на пятые и седьмые сутки, рост корешков в выше указанной концентрации останавливался, корешки начинали темнеть и большинство семян погибало. В то время как в концентрациях  $3 \cdot 10^{-4}$  и  $3 \cdot 10^{-5}$  моль/л показатели выживаемости равно как и рост с развитием были значительно выше или на равнее с контролем (таблица 2, диаграммы 2, 3).

Таблица 2. Динамика роста побегов и корешков у проростков подсолнечника и кресс-салата в течение недели

Соединение	Концентрация (моль/л)	Семена подсолнечника						Семена кресс-салата					
		3 день		5 день		7 день		3 день		5 день		7 день	
		Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)	Средняя длина корешка (см)	Средняя длина побега (см)
1	$3 \cdot 10^{-3}$	0,5	0	1,1	0,6	1,5	0,7	1,1	0,4	1,9	1,2	0	1,4
	$3 \cdot 10^{-4}$	0,4	0	1,1	0,4	1,7	1,9	1,3	0,5	1,5	1,8	1,9	3,1
	$3 \cdot 10^{-5}$	0,3	0	1,0	0,5	1,8	2,9	1,2	0,5	1,4	1,4	2,9	4,3
2	$3 \cdot 10^{-3}$	0,4	0	1,3	0,7	0	1,0	0,7	0,4	1,0	1,7	0	1,6
	$3 \cdot 10^{-4}$	0,4	0	1,5	1,0	3,1	2,9	1,5	0,5	2,9	2,3	4,1	4,0
	$3 \cdot 10^{-5}$	0,4	0	1,2	0,6	3,2	3,1	1,5	0,5	2,1	1,9	4,3	4,5

Конт- роль	—	0,4	0	0,8	0,5	2,8	3,0	1,1	0,4	1,0	1,2	2,0	3,1
---------------	---	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Диаграмма 2. Динамика длины ростка в растворах 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислоты

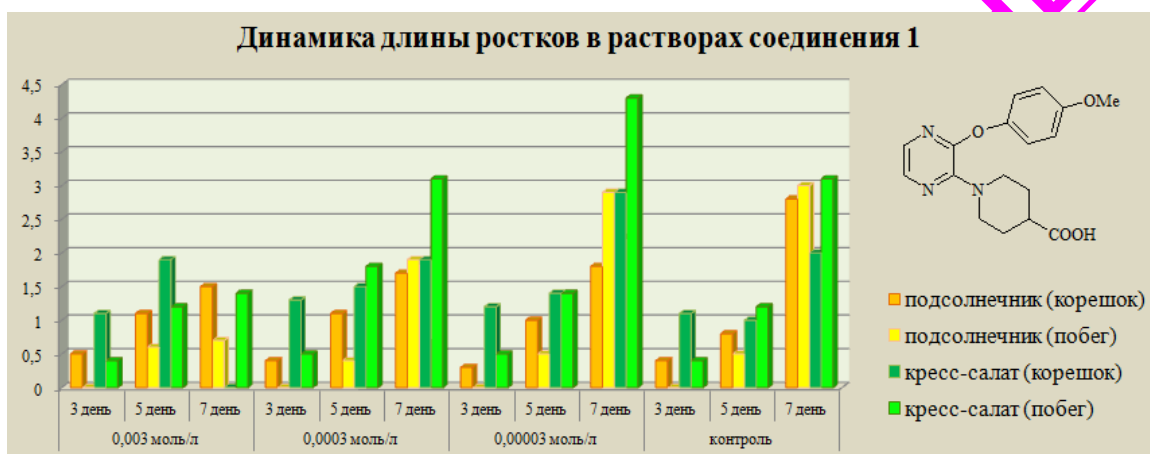


Диаграмма 3. 1-(3-((n-толил)тио) -пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновая кислота



### 3.2. Компьютерная оценка спектра биологической активности замещенных пиразина

Поиск новых потенциальных лекарственных препаратов связан с проведением дорогостоящих и трудоемких синтезов, а также биологических испытаний, включающих доклиническую стадию, определение токсикологических характеристик, выявление сопутствующих и

нежелательных побочных явлений мутагенного и канцерогенного характера и др. Зачастую эти затраты оказываются напрасными, так как новые синтезированные соединения не проявляют требуемой активности. Во избежание больших затрат времени и средств, весьма эффективным является проведение компьютерного скрининга.

Методы, первоначально предложенные для прогноза спектра биологической активности, в настоящее время претерпели существенные изменения. Эти изменения базируются как на теоретическом анализе методики прогнозирования, так и на имеющемся опыте ее применения для поиска веществ с требуемыми свойствами [33].

Современная версия компьютерной системы предсказания спектра биологической активности *PASS C&T* (Prediction of Activity Spectra for Substances: Complex & Training) реализована в 1998 году. Она включает в себя обучающую выборку, содержащую более 30 000 биологически активных веществ с известной биологической активностью, и охватывает более 400 фармакологических эффектов, механизмов действия, а также мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность. Ныне химическая структура описывается в виде предложенных сотрудником Лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств НИИ Биомедхимии РАМН к.ф.-м.н. Д.А.Филимоновым многоуровневых атомных окрестностей (MNA), которые генерируются автоматически на основе MOL или SDF файлов (MDL Information Systems, Inc.), являющихся в настоящее время *de facto* стандартом для компьютерного представления структурных формул химических веществ. MOL и SDF файлы экспортируются программами *ISIS/Draw* и *ISIS/Base* (MDL Information Systems, Inc.), которые представляют собой химический редактор и систему управления химическими базами данных [37].

Математический подход, используемый в *PASS C&T*, выбран Д.А.Филимоновым в результате сравнительного анализа 300 различных

методов [33]. Показано, что средняя точность прогноза с помощью *PASS C&T* при скользящем контроле с поочередным исключением по одному соединению из обучающей выборки составляет около 84%. Путем случайного разбиения обучающей выборки на две примерно равные подвыборки и перекрестного прогноза спектра активности для веществ одной из них (тестовой) с использованием другой в качестве обучающей продемонстрирована высокая статистическая устойчивость используемого алгоритма.

Биологическая активность описывается в *PASS C&T* качественным образом ("да"/"нет"). Выдаваемые результаты прогноза помимо названий активности включают в себя оценки вероятностей наличия ( $P_a$ ) и отсутствия каждой активности ( $P_i$ ), имеющие значения от 0 до 1. Поскольку эти вероятности рассчитываются независимо, их сумма не равна единице [37].

Для оценки биологической активности исследуемых соединений было так же проведено компьютерное моделирование с помощью системы *PASS*.

Анализ полученных данных показывает, что для исследуемых замещенных пиперазинов прогнозируется достаточно широкий спектр видов активности, что делает их перспективными для дальнейшего более глубокого биологического тестирования (таблицы 3, 4)

Таблица 3. Оценка биологической активности с помощью системы *Pass* для 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиперазин-2-ил)пиперидин-4-карбоновой кислоты

$P_a$	$P_i$	Вид активности
0,750	0,005	Активизация обменных процессов, приводящая к повышению липолиза.
0,645	0,039	Антиишемическое свойство
0,650	0,045	Фибринолитическое свойство
0,580	0,014	Антидиабетическое свойство
0,572	0,033	Ингибитор гастрина
0,550	0,015	Антагонист тромбксана B2

0,561	0,051	Лечение острых неврологических расстройств
0,522	0,043	Ингибитор птерин диаминазы
0,519	0,058	Цитопротекторное свойство

Таблица 4. Оценка биологической активности с помощью системы Pass для 1-(3-((n-толил)тио)-пирозин-2-ил) пиперидин-4-карбоновая кислота

Pa	Pi	Вид активности
0,632	0,024	Ингибитор флавопротеин дегидрогеназы, участвующей в дыхательной цепи переноса электронов.
0,624	0,022	Ингибитор птерин диаминазы
0,655	0,062	Противоэземной свойство
0,648	0,081	Защита слизистых оболочек
0,563	0,010	Ингибиторы клеточной адгезии
0,601	0,053	Ингибитор глутамил эндопептидазы 2
0,552	0,042	Ингибитор гастрина
0,556	0,053	Лечение острых неврологических расстройств
0,582	0,083	Фибринолитические (тромболитические) свойства
0,522	0,026	Ингибитор гидролазы
0,527	0,042	Ингибитор протеаз, расщепляющих инсулин

## 4. Экспериментальная часть

### 4.1. Методика синтеза 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиазин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой и синтеза 1-(3-((п-толил)тио)-пиазин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислот

Смесь 0,1 моль, 0,1 моль этилового эфира пиперидин-4-карбоновой кислоты, 0,11 моль КОН, 10 г KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,01 моль 18-краун-6 в 100 мл ДМСО перемешивали 24 час при температуре 100°C. К фильтрату после отделения осадка неорганических солей прибавляли раствор 0,25 моль КОН в 250 мл воды и перемешивали 2 час при 80-90°C. Раствор отфильтровывали, фильтрат нейтрализовали конц. HCl и оставляли на ночь для кристаллизации. Выпавший осадок промывали водой и высушивали.

Данные 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиазин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислоты: выход 43%. Т. пл. 172-174 °C. R<sub>f</sub> 0.08 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 19:1). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д. (J, Гц): 12.21 с (1H, COOH), 7.94 д (1H, H<sup>6</sup>, <sup>3</sup>J = 2.4), 7.84 д (1H, H<sup>5</sup>, <sup>3</sup>J = 2.4), 7.34 д (2H, H<sup>2,6</sup>, <sup>3</sup>J = 7.8), 7.22 д (2H, H<sup>3,5</sup>, <sup>3</sup>J = 7.8), 2.38 с (3H, CH<sub>3</sub>), 3.81 д (1H, He<sup>2''</sup>, <sup>3</sup>J = 12,2), 3.62 д (1H, He<sup>6''</sup>, <sup>3</sup>J = 12,2), 2.93 т (1H, Ha<sup>2''</sup>, <sup>3</sup>J = 10.7), 2.84 т (1H, Ha<sup>6''</sup>, <sup>3</sup>J = 11.6), 1.85 м (1H, He<sup>4''</sup>), 1.67, м (1H, Ha<sup>4''</sup>), 1.70, м (1H, He<sup>5''</sup>), 1,6 м (1H, Ha<sup>5''</sup>).

Данные 1-(3-((п-толил)тио)-пиазин-2-ил) пиперидин-4-карбоновой кислоты: выход 44%. Т. пл. 174-176 °C. R<sub>f</sub> 0.09 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 19:1). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д. (J, Гц): 12.23 с (1H, COOH), 7.95 д (1H, H<sup>6</sup>, <sup>3</sup>J = 2.5), 7.85 д (1H, H<sup>5</sup>, <sup>3</sup>J = 2.6), 7.36 д (2H, H<sup>2,6</sup>, <sup>3</sup>J = 7.9), 7.23 д (2H, H<sup>3,5</sup>, <sup>3</sup>J = 7.9), 2,38 с (3H, CH<sub>3</sub>), 3.81 д (1H, He<sup>2''</sup>, <sup>3</sup>J = 12,4), 3.62 д (1H, He<sup>6''</sup>, <sup>3</sup>J = 12,2), 2.93 т (1H, Ha<sup>2''</sup>, <sup>3</sup>J = 10.7), 2.84 т (1H, Ha<sup>6''</sup>, <sup>3</sup>J = 11.6), 1.85 м (1H, He<sup>4''</sup>), 1.67, м (1H, Ha<sup>4''</sup>), 1.70, м (1H, He<sup>5''</sup>), 1,6 м (1H, Ha<sup>5''</sup>).



## 4.2. Приготовление растворов

Молярные массы исследуемых веществ равны 329 г/моль, потому для приготовления растворов одинаковых концентраций были взяты одинаковые массы данных веществ.

Для приготовления 0,1 % раствора с концентрацией  $3 \cdot 10^{-3}$  моль/л было взято 1 г вещества; для 0,01% раствора с концентрацией  $3 \cdot 10^{-4}$  моль/л – 0,1 г вещества; для 0,001% раствора с концентрацией  $3 \cdot 10^{-5}$  моль/л – 0,01 г вещества;

Вещества были растворены в одинаковом объеме ДМСО (20 мл) и доведены водой до метки на конической колбе объемом 1 л.

## 4.3. Методика ВИР. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям

Биологическую активность соединений оценивали по результатам сравнения проростков растений, обработанных веществом, с контролем. Одну часть семян замачивали в растворе воды с ДМСО (контроль), а другую – в водных растворах вещества. Для этого в чашку Петри на фильтровальную бумагу помещали 10 семян испытываемого растения, сверху накрывали двойным листом фильтровальной бумаги. На фильтровальную бумагу прикапывали 10 – 20 мл рабочего раствора анализируемого вещества, чашку Петри накрывали покровным листом. Семена выдерживали в рабочем растворе в течение 4 – 6 ч при температуре 25 °С. Это время, необходимое для набухания семян до влажности, при которой достигается наибольшая энергия прорастания. Дальнейшее выращивание проростков также проводили в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в течение 7 суток при температуре 25 °С, после чего измеряли длину побега и корешка в мм. Все опыты проводили четырехкратно.



## 5. Выводы

В заключении по работе были сделаны следующие выводы:

- проведено биологическое тестирование, которое показало, что по всем сравниваемым критериям (всхожесть, выживаемость, средние длины корешков, побегов и ростков в целом) по мере снижения концентраций обоих веществ, показатели возрастают, следовательно, в небольших концентрациях исследуемые вещества оказывают положительное действие на рост и развитие тест-объектов;
- 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиразин-2-ил)пиперидин-4-карбоновая кислота во всех концентрациях оказывает угнетающее действие на рост и развитие проростков подсолнечника, но в наименьшей концентрации ( $3 \cdot 10^{-5}$  моль/л) активизирует рост и развитие проростков кресс-салата.
- 1-(3-((п-толил)тио)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновая кислота в средней и наименьшей концентрациях как для семян подсолнечника, так и кресс-салата активизирует рост и развитие их проростков.
- ✓ Проведено компьютерное моделирование с помощью системы PASS, которое показало, что с большей вероятностью (65-75%) 1-(3-(4-метоксифенокси)-пиразин-2-ил)пиперидин-4-карбоновая кислота обладает такими видами активности как: фибринолитическое и антиишемическое свойство, а так же имеется способность активизировать обменные процессы, приводящие к повышению липолиза.
- 1-(3-((п-толил)тио)-пиразин-2-ил) пиперидин-4-карбоновая кислота с вероятностью (60-65%) может быть использована для защиты слизистых оболочек и в качестве противоземных средств.
- Всё это делает исследуемые вещества перспективными для дальнейшего более глубокого биологического тестирования.

## 6. Список использованной литературы

1. Абрамов, И.Г. Применение гетероциклических соединений/ И.Г.Абрамов, В.В. Плахтинский// Изв. Вузов. – 2002. – №3. – С. 45.
2. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: пособие по фармакотерапии для врачей / М.Д. Машковский. – Минск: 1987. – 527 с.
3. Laurent. Sintes Amaron / Laurent // Ann. – 1844. – № 52. – P. 356.
4. Wolff, L. Ueber das Pyrasin / L. Wolff // Ber. – 1893. – № 26. P. 721.
5. Dalmer, Walter / repM. naT. 632257 // C. A. – 1936. – № 30. – P. 6894.
6. Krems. The Pyrazines / Krems, Spoerri // Chem. Revs. – 1947. – № 40. – P. 279.
7. Kushneretal // J. Am. Chem. – 1973. – Soc. 74. – P. 3617.
8. Гембицкий, Ю.А. Общая и органическая химия, пер. с англ. Т. 8. М. Comprehensiv heterocyclic chemistry. V. 3. Oxf / Ю.А. Гембицкий. – М.: 2006. – 256 с.
9. Катриций, А. А.,. Химия гетероциклических соединений, пер с англ. / А.А. Катрицкий, Д.Е. Лаговская, под ред. А.И. Коста. – М.: 1998. – 235 с.
10. Apoptotic protease inhibitors / Y. Han, A. Giroux, J. Coiucci, C. I. Bayly, Mckay, et al. // Med. Chem. Lett. – 2005. – № 15. – P. 1173-1180.
11. Phosphorylase inhibitors / Jr. Dudash, Y. Zhang, J. B. Moore, et al. // Med Chem. Lett. – 2005. – № 15. – P. 4790-4793.
12. Transcriptase of HIV-specific / J. Heeres, M. R. de Jonge, L. M. H. Koymans, et al. // Med. Chem. – 2007. – № 48. – P. 1910-1918.
13. Джилкрист, Т. Химия гетероциклических соединений: пер. с англ. / Т. Джилкрист. – М.: Мир. – 2003. – 464 с.
14. Нейланд, О.Я. Органическая химия: учеб. для хим. спец. Вузов / О.Я. Нейланд. – М.: Высш. шк. – 2005. – 751 с.
15. Джоуль, Дж., Основы химии гетероциклических соединений, пер. с англ. / Дж. Джоуль, Г. Смит, под. ред. В.Т. Яшунского. – М.: Мир. – 2004. – 453 с.

16. Wolff, L. Synthese des Pyrazins / L. Wolff // Ber. – 2004. – № 26. – P. 1830.
17. Comprehensive Heterocyclic Chemistry / Ed. by A.R. Katritzky and C.W. Rees. V.3. Elsevier, Oxford. – 1997.
18. Rudenburg. Zur Kenntniss des p-Tolacyl-amins / Rudenburg // Ber. – 2000. – № 46. – P. 3555.
19. Ahrens. Ueber Dimethylpyrasin / Ahrens, Meissner // Ber. – 2001. – № 30. – P. 532.
20. Winans, Adkins // J. Am. Chem. Soc. – 1998. – № 55. – P. 2051, 4167.
21. Kolshorn. Zur Kerutuiss der Aminoketone / Kolshorn // Ber. – 2004. – № 37. – P. 2474.
22. Mason // J. Chem. Soc. – 2000. – № 55. – P. 97.
23. Amundsen // J. Chem. Educ. – 1999. – № 16. – P. 567.
24. Schomaker, Pauling // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – № 61. – P. 1769.
25. Stoehr, J. // prakt. Chem. – 2002. – № [2] 47. – P. 439.
26. Пакетт, А. Основы современной химии гетероциклических соединений / А.Пакетт. – М.: Мир. – 2001. – 231 с.
27. Hart, Spoerri // J. Am. Chem. Soc. – 2002. – № 77. – P. 5898.
28. Aston, J. // Am. Chem. Soc. – 1998. – № 52. – P. 4172, 5254.
29. Krems, Spoerri // Chem. Revs. – 2000. – № 40. – P. 279.
30. Newbold, Spring, Gallagher et al. // J. Chem. Soc. – 2001. – № 147. – P. 910.
31. Kipping // J. Chem. Soc. – 1998. – № 192. – P. 2889.
32. Gastaldi // Gazz. chim. ital. – 2001. – № 51. – P. 233.
33. Tutin // J. Chem. Soc. – 2005. – № 97. – P. 2495.
34. Karmas, Spoerri // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – № 75. – P. 5517.
35. Малиновский, В. И. Физиология растений: учеб. пособие / В.И. Малиновский. – СПб.: 2004. – 106 с.
36. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. – СПб.: ВИР. – 1998. – С. 79.

37. , Поройков, В.В. Компьютерная оценка свойств химических соединений с помощью системы PASS / В.В. Поройков, Д.А. Филимонов// Хим.-фарм. ж. – 2004. – Т.32. – С. 32-39.

Любое копирование и  
тиражирование запрещено