



УДК 547.781.5 : 541.515—547.793

© 1990 г.

*Т. А. Березина, В. В. Мартин, Л. Б. Володарский,
В. В. Храмов*, Л. М. Вайнер**

СИНТЕЗ АМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ИМИДАЗОЛИНА — НОВОЙ СЕРИИ pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ И МЕТОК

Новосибирский институт органической химии СО АН СССР;

** Институт химической кинетики и горения СО АН СССР, Новосибирск*

Разработан метод синтеза амидинов — 4-(алкиламино)-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксидов, основанный на реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения нитроксильного радикала, содержащего нитронную группировку, к изоцианатам с последующим щелочным гидролизом образующихся аддуктов. Спиновые метки, содержащие более сложные заместители, получены модификацией моноаддукта радикал-нитрона с толуол-2,4-диизоцианатом. Полученные спиновые зонды и метки пригодны для измерения локальных значений pH в биологических объектах в диапазоне значений 4—7.

Метод спиновых меток, основанный на использовании нитроксильных радикалов в качестве узнаваемых методом ЭПР молекул-репортеров, широко применяется в биологических исследованиях [1]. Перспективное направление развития этого метода — введение в последовательскую практику соединений, спектр ЭПР которых зависит от pH среды [2, 3]. Использование pH-чувствительных спиновых меток позволяет измерять величину pH в микрообъемах клеточных органелл, скорость переноса протонов через мембраны липосом [4].

Поскольку сама нитроксильная группа (нитроксильный радикальный центр) — чрезвычайно слабое основание [5], в качестве pH-чувствительных спиновых меток применяют соединения, объединяющие в одной молекуле нитроксильный радикальный центр и индикаторную группировку, способную к обратимому протонированию [4]. Проблемы молекулярного дизайна подобных соединений связаны с тем, что для проявления регистрируемой чувствительности спектра ЭПР к pH индикаторная группировка должна быть максимально приближена к нитроксильному радикальному центру, который является сильной электроноакцепторной группировкой и значительно (на 3—5 порядков) понижает основность индикаторных групп [6]. Поэтому ассортимент pH-чувствительных спиновых меток, пригодных для измерений pH в биологическом диапазоне значений, т. е. имеющих рК 5—8, весьма невелик [4].

Продолжая изучение химии гетероциклических нитроксильных радикалов — производных имидазолина [7], мы рассмотрели возможность синтеза pH-чувствительных спиновых зондов на основе гетероцикла имидазолина, в котором наряду с азотом нитроксильного радикального центра содержится второй атом азота, способный к протонированию. Вследствие близкого расположения к нитроксильному радикальному центру основные свойства этого атома азота сильно понижены (ср. [8]), однако можно было предположить, что включение его в состав высокоосновной амидиновой группировки позволит получать соединения с рК порядка 5—8. Незамещенный амидин подобного строения (I, R=H), синтезированный перегруппировкой Гоффмана соответствующего амида [9], имеет величину рК 6,1 [3, 7], однако обладает низкой липофильностью. Цель настоящей работы — разработка общего метода синтеза амидинов (производных нит-

Синтезированные пергидроимидазо[1,5-d]оксадиазолы

Таблица 1

Соединение	Условия получения		Выход, %	Т. пл., °С	ИК-спектр (в КВг), см ⁻¹		УФ-спектр (этанол)		Найдено/Вычислено, %				Брутто-формула
	время, ч	°С			ν _{C=O}	Другие полосы	λ _{max} , нм	lg ε	C	H	N	Cl	
(IVa)	10	20	54	164-167 *	1750		204	4,54	62,3	6,8	14,2		C ₁₅ H ₂₀ N ₃ O ₃
(IVб)	10	20	89	175-176 **	1750		241	4,24	62,1	6,9	14,5		C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃ Cl
(IVв)	20	70	42	Жидкость	1780 **		208	4,43	54,1	5,5	13,2	11,8	
(IVг)	30	70	40	88-91 *	1750		247	4,36	54,1	5,5	13,5	11,4	
(IVд)	10	20	81	117-120 *	1750		243	3,00	56,7	8,9	16,1		C ₁₂ H ₂₂ N ₃ O ₃
(V)	10	20	95	197-199 **	1750	2290 (-N=C=O)	242	3,00	59,4	8,6	16,4		C ₁₄ H ₂₄ N ₃ O ₃
(VIIa)			58	185-186 **	1760	1720 (C=O)	236	3,42	45,7	6,5	16,2	13,5	
(VIIб)			24	117-119 **	1760	1730 (C=O)	280	3,60 **	57,9	5,7	16,6	13,5	
(VIIв)			32	138-140 **	1780	1740 (C=O)	225	4,30	58,0	5,7	16,9		C ₁₆ H ₁₉ N ₄ O ₄
(VIII)			4	179-180 **	1780	1750 (C=O)	227	4,44	71,2	9,0	7,8		C ₁₈ H ₂₅ N ₄ O ₅
(XIa)			33	118-119 **	1780	1705 (C=O)	242	4,33	72,0	9,1	7,8		C ₁₈ H ₂₅ N ₄ O ₅
(XIб)			26	149-150 **	1770	1705 (C=O)	247	4,68	56,3	5,4	22,8		C ₂₀ H ₂₄ N ₇ O ₄
(XIв)			25	95-98 **	1770	1695, 1670 (C=O)	286	3,81	60,4	5,9	18,4		C ₂₇ H ₃₂ N ₇ O ₅
							277	4,27	60,6	6,0	18,4		C ₁₉ H ₂₆ N ₅ O ₆
							233	4,52	54,2	6,3	16,5		
							285	3,62	54,3	6,2	16,7		
							295	3,32					

* Из смеси гексан — этилацетат (3 : 1).

** Из смеси гексан — этилацетат (1 : 3).

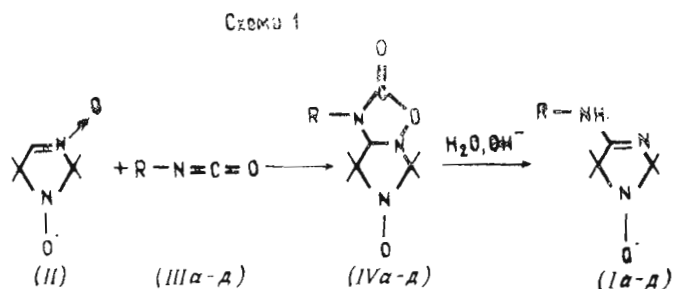
** В ССл.

** Из этилацетата.

** В КВг.

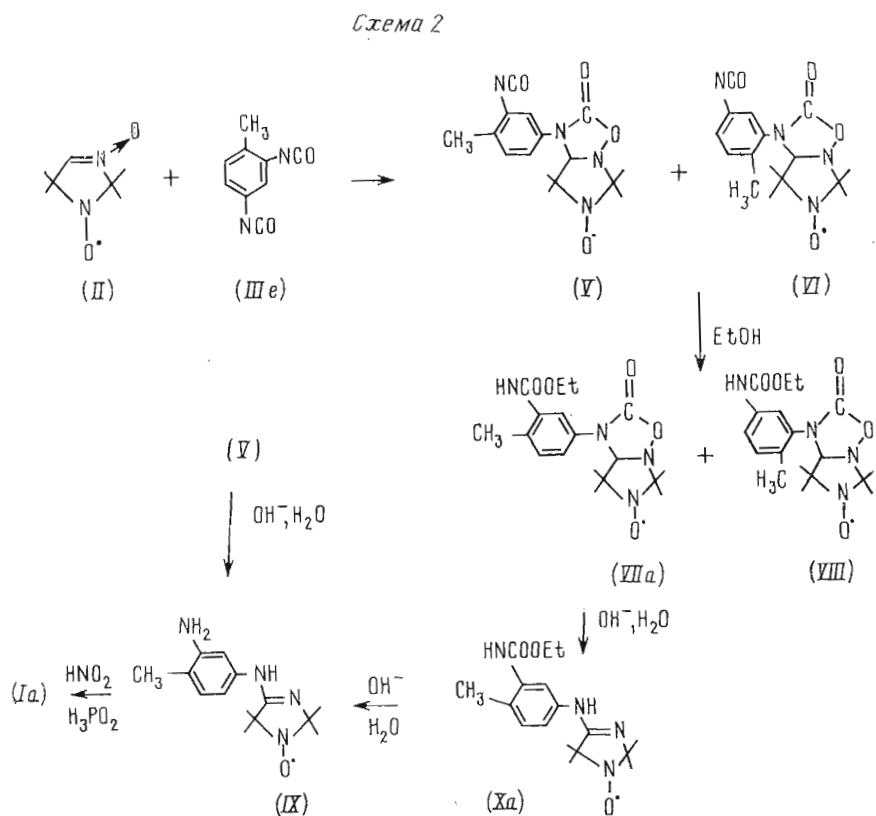
роксильных радикалов имидазолина), который мог обеспечить получение набора соединений, различающихся по липофильности и величине рК.

Синтез N-замещенных амидинов (Ia-d), структурно родственного соединению (I, R=H), удалось осуществить с помощью реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения парамагнитного гетероциклического альдонитрона - 2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-3-оксид-1-оксила (II) [10] - к изо-



а) R = 4-CH₃C₆H₄; б) R = 4-ClC₆H₄; в) R = C₄H₉; г) R = ; д) R = ClCH₂CH₂

цианатам (IIIa-d) с последующим разложением гетероциклических аддуктов - производных 3-алкил-4,4,6,6-тетраметил-5-оксид-2-оксопергидроимидазо[1,5-b]оксадиазолов-1,2,4 (IVa-d) обработкой водно-спиртовой щелочью (схема 1). Ранее образование амидина наблюдалось для аддукта дифенилнитрона с фенилизоцианатом [11], однако подобный способ синтеза не рассматривался в качестве препаративного. Циклоприсоединение нитрона-радикала (II) можно проводить как непосредственно в избытке изоцианата, так и в растворе с эквимолекулярным количеством реагента. В реакцию удается вводить как ароматические, так и алифатические изоцианаты, причем наличие электрооакцепторных групп в молекуле облегчает реакцию (табл. 1). В отличие от аддуктов гетероароматических N-оксидов с изоцианатами [12] соединения (IV) весьма устойчивы и могут



Синтезированные 4-алкиламино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксиды

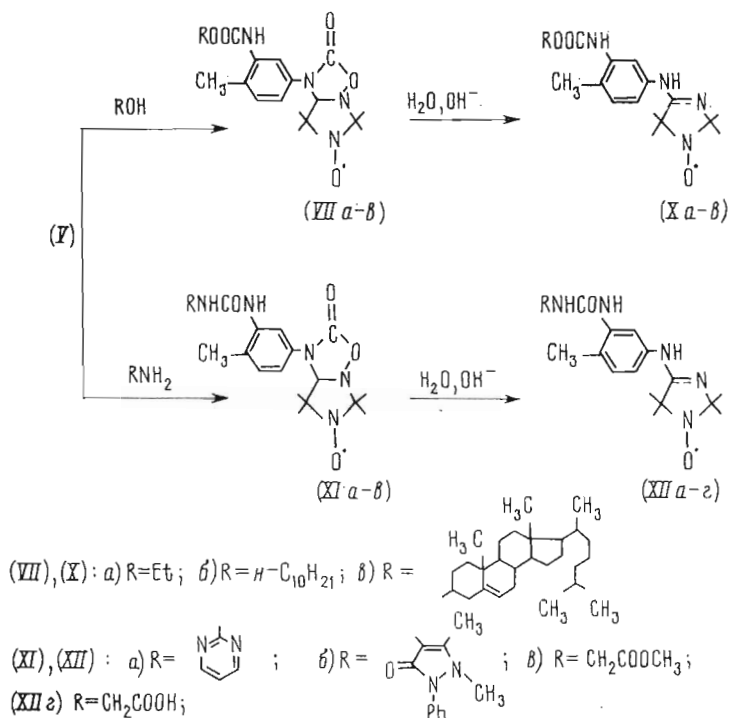
Соединение	Т. пл., °С	ИК-спектр (в КВГ), см ⁻¹		УФ-спектр (этанол)		рА	Найдено/Вычислено, %				Брутто-формула	Выход, %
		ν _{C=N}	Другие полосы	λ _{max} , нм	lg ε		C	H	N	Cl		
(Ia)	184–186 *	1620		240 258	4,36 4,28	5,10	68,3	8,1	16,9		C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O	53
(Iб)	221–223 *	1600 1640		244 265	4,13 4,38	4,50	68,3 58,7	8,1 6,6	17,1 15,6	13,1 13,3	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ OCl	77
(Iв)	28–32 **	1580 1640		240	3,25	6,60	58,5 61,7	6,4 10,3	15,8 19,6		C ₁₁ H ₂₂ N ₃ O	40
(Iг)	223–224 **	1620		235	3,00	6,40	62,3 65,2	10,4 10,0	19,8 17,2		C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O	61
(Iд)	178–182 *	1550 1640		235	3,08	5,60	65,6 49,4	10,1 8,0	17,7 19,0	15,9 16,3	C ₉ H ₁₇ N ₃ OCl	50
(Iх)	208–209 *	1620		232 255	4,28 4,05	5,05	49,4 64,1	7,8 8,4	19,2 21,7		C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O	37
(Ха)	180–181 *	1620 1640	1705 (C=O)	222 260	4,38 4,31	5,15	60,9 61,3	8,1 7,4	21,5 17,0		C ₁₇ H ₂₃ N ₄ O ₃	40
(Хб)	120–121 **	1610 1630	1705 (C=O)	227 260	4,38 4,30	5,00	67,2 67,4	9,1 9,2	12,6 12,6		C ₂₃ H ₄₁ N ₄ O ₃	44
(Хв)	182–183 **	1610 1630	1695 (C=O)	234 263	4,41 4,37	4,80	74,4 74,9	9,5 9,7	8,2 8,3		C ₄₂ H ₆₃ N ₄ O ₃	42
(ХIIа)	225–227 *	1605 1620	1700 (C=O)	224 253	4,39 4,54	4,95	59,7 59,7	6,1 6,3	25,3 25,7		C ₁₈ H ₂₄ N ₇ O ₂	55
(ХIIб)	120–121 *	1620	1700ш (C=O)	228 257	4,50 4,30	4,90	63,0 63,7	6,4 6,5	19,8 20,0		C ₂₈ H ₃₂ N ₇ O ₃	20
(ХIIг)	237–240 **	1605 1630	1720 (C=O)	213 260	4,16 4,22	4,75	56,4 56,4	6,4 6,6	18,9 19,3		C ₁₇ H ₂₂ N ₅ O ₄	27

* Из этилцетата.

** Очищен хроматографически.

*** Из смеси этилцетат – гексан (1 : 3).

**** Из смеси этилцетат – гексан (3 : 1).



быть выделены в аналитически чистом виде. В их ИК-спектрах наблюдаются характерные интенсивные полосы поглощения карбонильной группы в составе оксидиазольдидинового цикла при 1750–1780 см⁻¹. Синтез амидинов (I) можно проводить и без промежуточного выделения соединений (IV).

Синтезированные амидины (Ia–д) (табл. 2) обладают различной величиной *pK*, зависящей от акцепторных свойств заместителя R, разной растворимостью в неполярных органических растворителях и могут использоваться в качестве спиновых pH-зондов. Вместе с тем высокая реакционная способность изоцианатной группы по отношению к аминам, гидроксил- и другим функциональным группам ограничивает круг доступных изоцианатов, содержащихся в молекуле дополнительные функции, и не позволяет применить этот подход для синтеза соединений с более сложными заместителями, в том числе способных связываться с биомолекулами.

Для синтеза амидинов, содержащих более сложные заместители, было использовано циклоприсоединение альдонитрона (II) к толуол-2,4-диизоцианату (IIIe) (схема 2). В результате этой реакции образуется смесь региоизомерных продуктов моноприсоединения (V) и (VI), в ИК-спектре которой наблюдается интенсивная полоса поглощения —N=C=O-группы при 2290 см⁻¹. Количественный анализ смеси региоизомеров и ее препаративное разделение хроматографией затруднены из-за наличия в молекуле весьма реакционноспособной изоцианатной группы. Однако обработка смеси региоизомеров (V), (VI) этанолом приводит к смеси уретанов (VIIa), (VIIb), которая может быть легко проанализирована ВЭЖХ и препаративно разделена колоночной хроматографией. Данные ВЭЖХ указывают на преобладание соединения (VIIa) (≥90%) и, следовательно, на преимущественное присоединение нитрона (II) по пространственно более доступной изоцианатной группе толуол-2,4-диизоцианата. Однократная перекристаллизация смеси аддуктов циклоприсоединения (V), (VI) дает практически чистое соединение (V). Гидролиз этого соединения в щелочной среде приводит к амидину (IX), который также образуется и при нагревании в щелочном растворе уретана (VIIa). Деаминарование соединения (IX) путем превращения его в diazonиевую соль с последующей обра-

богкой *in situ* фосфорноватистой кислотой приводит к амидину (Ia), что однозначно доказывают структуры соединений (V) и (VIIa).

Следует отметить, что пергидрооксадиазолоновый цикл в условиях щелочного гидролиза более лабилен, чем уретановая группировка: обработка соединения (VIIa) щелочью на холоду вызывает образование амидина (Xa), в котором уретановая группа сохраняется.

Применение оксадиазолонового цикла в качестве защищенной амидиновой группировки позволило использовать реакционную способность изоцианатной группы соединения (V) для синтеза серии pH-чувствительных спинновых меток. Так, взаимодействие соединения (V) со спиртами — этанолом, *n*-деканолом и холестерином — приводит к уретанам (VIIa–в), которые при обработке щелочью превращаются в соответствующие амидины (Xa–в).

Реакция соединения (V) с аминами — 2-аминопиримидином, 4-аминоантипиринном и метиловым эфиром глицина — приводит к производным мочевины (XIa–в), которые при обработке водно-спиртовой щелочью гидролизуются в амидины (XIIa–в) (схема 3). В случае соединения (XIIв) деструкция гетероцикла оксадиазола сопровождается щелочным гидролизом сложноэфирной группы с образованием кислоты (XIIг).

Соединения (Xб, в) растворимы в неполярных органических растворителях, липидах и могут представить интерес для определения pH внутри модельных и природных мембран. Спин-меченая аминокислота (XIIг) была применена для химической модификации сывороточного альбумина человека, что позволило синтезировать макромолекулярный спинновый pH-зонд [12]. Величины *pK* синтезированных амидинов позволяют измерять с их помощью pH в диапазоне 4–7.

Экспериментальная часть

ИК-спектры записаны на приборе UR-20 (ГДР) в таблетках KBr и в растворах CCl_4 . УФ-спектры записаны на спектрофотометре Spexord UV-VIS (ГДР) в этаноле. Константы основности *pK* амидинов определены титрованием в плоской ампуле ЭПР спектрометра Bruker ER-200 SRC (ФРГ) по методу [8]; точность определения константы $\pm 0,05$ ед. Идентичность соединений устанавливали сравнением ИК-спектров и времен удерживания по ВЭЖХ. Анализ методом ВЭЖХ проводили на приборе «Обь-4» с колонкой (2×50 мм) на неподвижной фазе LiChrosorb RP-18 (Merck, ФРГ); подвижная фаза — водный метанол (50–80%). Для препаративной колоночной хроматографии использовали силикагель L40/100 мкм (ЧССР), элюент — $CHCl_3$. Для проведения реакций с изоцианатами $CHCl_3$ очищали от воды и следов спирта пропусканием через колонку с Al_2O_3 .

*3-Алкил-4,4,6,6-тетраметил - 5-оксил-2-оксопергидроимидазо[1,5-*b*]оксадиазолы-1,2,4 (IVa–d)*. К 0,01 моль радикала (II) в 10 мл $CHCl_3$ прибавляли 0,015 моль изоцианата (IIIa–д) и выдерживали 10–30 ч при 20–60° С (табл. 1). Хлороформ упаривали, остаток промывали гексаном и хроматографировали на колонке.

Выдерживание 0,01 моль радикала (II) в 5 мл изоцианатов (IIIa, б, г) 10 ч при 20° С и последующая обработка, аналогичная описанной выше, приводила к соединениям (IVa, б, г) с примерно тем же выходом.

Соединения (IVa–д) можно использовать для дальнейшего превращения их в амидины (I) без хроматографической очистки.

4-Алкиламино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксилы (Ia–г). К 0,01 моль соединений (IVa–д) в 85% этаноле прибавляли 0,02 моль КОН и выдерживали 10 ч при 20° С. Спирт упаривали, прибавляли 15 мл воды и экстрагировали $CHCl_3$. Хлороформный экстракт экстрагировали 1% H_2SO_4 . Кислый экстракт нейтрализовали до pH 7 и экстрагировали $CHCl_3$. Экстракт сушили $MgSO_4$, хлороформ упаривали и остаток подвергали флеш-хроматографии на колонке.

*3-(4-Метил-3-изоцианатофенил)- и 3-(6-метил-3-изоцианатофенил)-4,4,6,6 - тетраметил - 5 - оксил - 2 - оксопергидроимидазо[1,5-*b*]оксадиазо-*

лы-1,2,4 (V) и (VI). К 10 ммоль радикала (II) в 10 мл CHCl_3 прибавляли 15 ммоль толуол-2,4-динизоцианата (IIIe). Смесь выдерживали 10 ч при 20° С, осадок смеси соединений (V) и (VI) отфильтровывали и промывали гексаном. Перекристаллизация из этилацетата приводила к практически чистому соединению (V).

Взаимодействие смеси соединений (VI) и (V) с этанолом. К суспензии 3 ммоль соединений (V) и (VI) в 10 мл этанола прибавляли 2 капли триэтиламина и перемешивали 2 ч. Смесь упаривали и остаток хроматографировали на колонке.

Выход соединения (VIIa) 58%, соединения (VIII) 4%.

3-(4-Метил-3-аминофенил)амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксил (IX). А. Из соединения (V). Получали гидролизом соединения (V) в условиях синтеза амидинов (Ia—д). Б. Смесь 1,5 ммоль уретана (VIIa) и 7,5 ммоль КОН в 5 мл этанола нагревали 1 ч при 70° С, далее обрабатывали как при синтезе соединений (Ia—д). При выдерживании реакционной смеси в течение 30 мин при 20° С и последующей стандартной обработке был получен 4-(4-метил-3-этоксикарбамоилфенил)амино-2,2,5,5-тетраметил-3-имидазолин-1-оксил (Xa).

Деаминирование соединения (IX). К смеси 3,8 ммоль соединения (IX), 57 ммоль H_3PO_2 и 10 мл H_2O прибавляли при 0° С раствор 4,2 ммоль NaNO_2 . Смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 1 ч при 20° С, затем прибавляли 5% КОН до pH 12 и экстрагировали эфиром. Экстракт сушили MgSO_4 , упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем.

Взаимодействие соединения (V) со спиртами. К суспензии 3 ммоль соединения (V) в 15 мл CHCl_3 прибавляли 3,6 ммоль спирта и нагревали 40 ч при 70° С. Смесь упаривали и остаток хроматографировали на колонке.

Гидролиз соединений (VIIб, в) в производные 4-алкиламино-3-имидазолин-1-оксила (VIIIб, в) проводили в условиях гидролиза соединения (VIIa).

Взаимодействие соединения (V) с аминами. К суспензии 0,01 моль соединения (V) в 20 мл CHCl_3 прибавляли 12 ммоль амина (в случае метилового эфира глицина — 0,02 моль) и нагревали 10 ч при 70° С (в случае метилового эфира глицина — 1 ч при 20° С). Раствор упаривали и остаток хроматографировали на колонке.

Гидролиз соединений (XIа—в) в производные 4-алкиламино-3-имидазолин-1-оксила (XIIа, б, г) проводили в условиях гидролиза соединений (VIIa—в).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метод спиновых меток и зондов: проблемы и перспективы./Ред. Эмануэль Н. М., Жданов Р. И. М.: Наука, 1986. 270 с.
2. Keana J. F. W., Acarrequi M. I., Boyle S. L. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 3. P. 827—830.
3. Khrantsov V. V., Weiner L. M., Grigor'ev I. A., Volodarsky L. B. // Chem. Phys. Lett. 1982. V. 91. № 1. P. 69—72.
4. Храпцов В. В., Вайнер Л. М. // Успехи химии. 1988. Т. 40. № 9. С. 1440—1466.
5. Malatesta V., Ingold K. U. // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. № 19. P. 6404—6407.
6. Щукин Г. И., Григорьев И. А., Удачин К. А., Коробейничева И. К., Володарский Л. Б. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1984. № 12. С. 2694—2697.
7. Володарский Л. Б., Григорьев И. А., Диканов С. А., Резников В. А., Щукин Г. И. Имидазолиновые нитроксильные радикалы. Новосибирск: Наука, 1988. 212 с.
8. Храпцов В. В., Вайнер Л. М., Григорьев И. А., Резников В. А., Щукин Г. И., Володарский Л. Б. // Журн. хим. физики. 1985. Т. 4. № 5. С. 637—643.
9. Volodarsky L. B., Grigor'ev I. A., Sagdeev R. Z. // Biological Magnetic Resonance. V. 2/Ed. Berliner L. J. N. Y.: Plenum Press, 1980. P. 169—241.
10. Мартин В. В., Володарский Л. Б., Войнов М. А., Березина Т. А., Лелюх Т. Ф. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1988. № 8. С. 1875—1882.
11. Black D. St. C., Crozier R. F., Davis V. C. // Synthesis. 1975. № 4. P. 205—221.
12. Harano K., Suematsu F., Matsuoka T., Hisano T. // Chem. Pharm. Bull. 1984. V. 32. № 2. P. 543—552.

Поступила в редакцию
22.III.1989

T. A. BEREZINA, V. V. MARTIN, L. B. VOLODARSKY,
V. V. KHRAMTSOV*, L. M. WEINER*

**SYNTHESIS OF AMIDINES — IMIDAZOLINE NITROXIDE
DERIVATIVES — A NEW SERIES OF pH-SENSITIVE SPIN PROBES
AND SPIN LABELS**

Novosibirsk Institute of Organic Chemistry:

** Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A synthesis of amidines, 4-(R-amino)-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-1-oxyl derivatives, is described. The method is based on the alkaline hydrolysis of products of 1,3-dipolar cycloaddition of nitroxide, containing a nitrone grouping, with isocyanates. Structurally more complex spin labels were obtained by monoadduct of the above-mentioned nitrone-nitroxide with the toluene-2,6-diisocyanate modification. The resulting spin probes and spin labels may be used for measuring the local pH values withing the range 1.8–4.6 in biological objects.