



УДК 615.779.931+547.859.04:543.253

ПОЛУЧЕНИЕ АНИОН-РАДИКАЛОВ АНТИБИОТИКОВ
ПИРИМИДО [5,4-е]-1,2,4-ТРИАЗИНОВОЙ ГРУППЫ

Казакова В. М., Макаров И. Г., Мещина Н. Е.

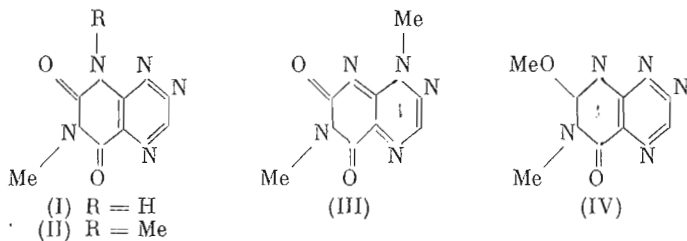
Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Есипов С. Е., Чернышев А. И.

Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков

Электрохимическим восстановлением получены анион-радикалы антибиотиков пиримидо[5,4-е]-1,2,4-триазиновой группы: фервинулина, метилированного енола реумицина и ксантотрицина. Спектры ЭПР анион-радикалов указывают на делокализацию неспаренного электрона в триазиновом фрагменте.

Сравнительное изучение антибиотиков реумицина (I) [1], фервинулина (II) [2], ксантотрицина (III) [3] и метилированного енола реумицина (IV) [4] показало, что они усиливают окисление глюкозы интактными клетками асцитной опухоли Эрлиха, а также препаратом митохондрией этих клеток и снимают ингибирующее действие ротенона, антимицина А и цианида [4, 5]. Антибиотики (I), (II) и (IV) проявляют такую активность в концентрациях порядка 1 мМ, тогда как действующая концентрация ксантотрицина (III) в 100 раз меньше. Аналогичная закономерность наблюдалась и при изучении токсичности этих антибиотиков [5]. Обнаруженное явление объяснялось способностью антибиотиков акцептировать электроны с NADH-цитохром- b_5 -редуктазной цепи [6] и переносить их на кислород. Биологическое действие, в том числе и токсичность, может проявляться либо в результате шунтирования дыхательной цепи, либо за счет накопления продуктов биохимических реакций, в которых участвуют эти антибиотики, а именно перекиси водорода [7] или супероксидных радикалов [8].



Для принципиальной проверки вышеприведенных предположений и выяснения корреляции между биологической активностью и химическим строением мы изучили методом полярографии сравнительную способность этих антибиотиков к электрохимическому восстановлению, приводящему в

Результаты полярографического анализа и характеристики спектров ЭПР анион-радикалов антибиотиков (I)–(IV)

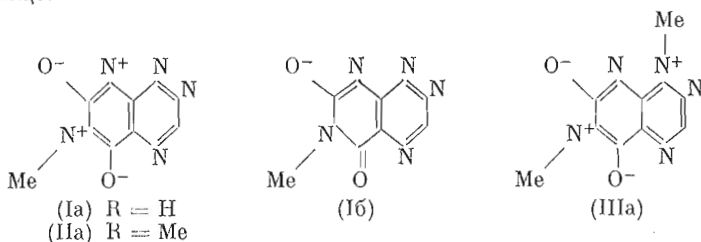
Антибиотик	Полярография		Спектры ЭПР
	$-E_{1/2}^*$	ΔE^{**}	
Реумицин (I)	1,28	0,06	См. пояснения в тексте
	1,86	0,06	
	2,40	0,12	
Фервенулин (II)	1,30	0,06	7 линий а _N 4,40 Э
	2,10	0,06	
Ксантотрицин (III)	0,97	0,06	10 линий $\text{CH}_2 = a_N = 5,20 \text{ Э}$ \downarrow H
	1,92	0,07	
Метилированный евол реумицина (IV)	1,45	0,07	7 линий а _N 4,56 Э
	2,25	0,07	

* Измерено относительно Ag/AgClO₄ (0,1 M) — (n-C₄H₉)₄NCIO₄ (0,1 M) электрода сравнения в диметилформамиде.

** $\Delta E = E_{1/4} - E_{3/4}$.

случае соединений (II)–(IV) к образованию устойчивых анион-радикалов. Строение анион-радикалов установлено с помощью спектроскопии ЭПР.

Результаты полярографического анализа (таблица) показывают, что первые волны восстановления антибиотиков (I)–(IV) являются одноэлектронными и обратимыми, а вторые смещены на 0,8–1,0 В в катодную область и необратимы. Положение метильной группы оказывает большое влияние на значения потенциалов первых полуволн восстановления. Так, $E_{1/2}^1$ для ксантотрицина (III) на 0,33 В сдвинут в положительную область по сравнению с фервенулином (II) и на 0,48 В — по сравнению с изомером (IV). Существенные различия в значениях $E_{1/2}^1$ для ксантотрицина (III) и антибиотиков (I), (II), (IV) свидетельствуют о значительном различии энергий нижних свободных молекулярных орбиталей, на которые переносится электрон от донора электрона, или ртутного катода в процессе образования анион-радикалов. Эти энергии антибиотиков (I), (II) и (IV) в основном определяются триазиновым циклом, так как пиримидиновое кольцо, состоящее фактически из двух ацетамидных групп со значительными вкладами внутриионизированных состояний (Ia, IIa), должно оказывать слабое влияние на характер делокализации π -электронов в триазиновом кольце.



Для ксантотрицина (III) вероятнее всего состояние (IIIa) с некоторым дефицитом π -электронной плотности в триазиновом цикле, что объясняет более легкое восстановление ксантотрицина, т. е. сдвиг значения $E_{1/2}^1$ в положительную область по сравнению с другими антибиотиками.

Значения потенциалов полуволн восстановления реумицина показывают, что вторая полярографическая волна, по-видимому, соответствует восстановлению аниона (Iб), который присутствует в растворах реумици-

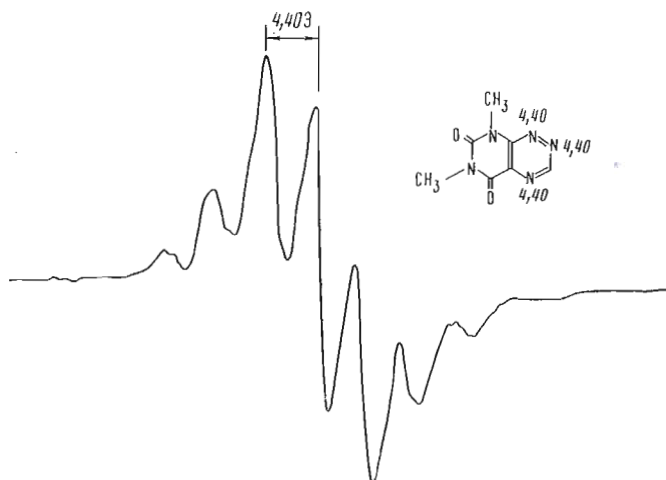


Рис. 1. Спектр ЭПР анион-радикалов ферредоксина (II)

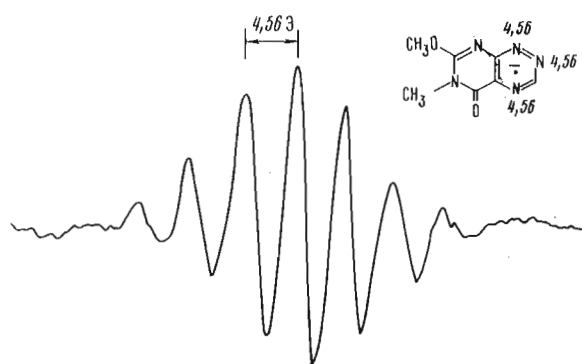


Рис. 2. Спектр ЭПР анион-радикалов метилированного сполу реумицина (IV)

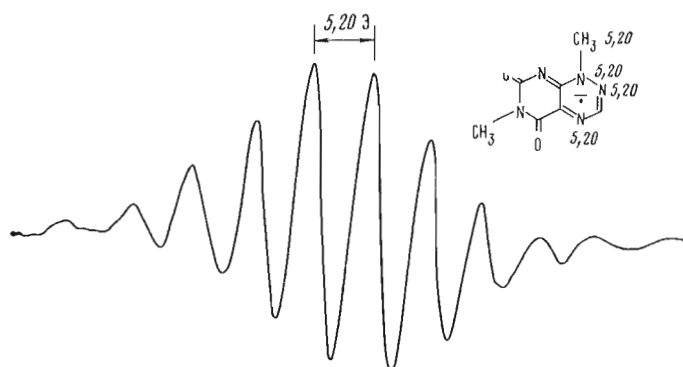


Рис. 3. Спектр ЭПР анион-радикалов ксантоксантина (III)

на. Значение pH 6,3, при котором проводили полярографические измерения, определяет соотношение реумицина — анион (Iб) = 0,6 : 0,4 (для реумицина pK_B 6,5).

Результаты полярографических исследований были использованы для выбора оптимальных условий электрохимической генерации анион-радикалов антибиотиков (I) — (IV). Значительные различия потенциалов пер-

вых и вторых волн позволяют проводить генерацию анион-радикалов без контроля потенциала, при напряжении электролиза на 0,5–0,6 В больше, чем $E_{1/2}^I$. Спектры ЭПР анион-радикалов фервинулина (II) и метилированного енола реумицина (IV) характеризуются сверхтонкой структурой (СТС), включающей в себя семь линий с константами расщепления a_N 4,40 и 4,56 Э соответственно и обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с ядрами трех атомов ^{14}N триазинового фрагмента (таблица, рис. 1, 2). Отсутствие расщепления от ядер атомов азота и водорода пиримидинового кольца свидетельствует о том, что неспаренный электрон в основном делокализован в триазиновом фрагменте. Это подтверждает высказанное выше утверждение о незначительном влиянии пиримидинового кольца на характер делокализации неспаренного электрона в анион-радикалах соединений (II) и (IV).

Электрохимическое восстановление ксантотрицина (III) приводит к образованию устойчивых анион-радикалов, спектр ЭПР которых состоит из 10 линий с константой расщепления $a_{\text{H}}^{\text{CH}_3} \approx a_N \approx 5,20$ Э (рис. 3). Этот спектр идентичен ранее описанному спектру ЭПР анион-радикалов токсифлавина (синоним ксантотрицина), полученных нагреванием антибиотика до 80–100°С в диметилацетамиде и диметилформамиде [8]. Мультиплетность и интенсивность линий спектра ЭПР свидетельствуют о близких значениях констант расщепления от трех атомов азота и трех протонов метильной группы триазинового фрагмента.

Хотя полярографические исследования показали, что первая волна восстановления реумицина (I) является одноэлектронной, спектры ЭПР первичных анион-радикалов зарегистрировать не удалось. По-видимому, анион-радикалы реумицина (I) малостабильны и быстро претерпевают химические превращения. Лишь значительное повышение потенциала восстановления (до 3 В) приводит к появлению парамагнитных частиц, малоинтенсивный спектр ЭПР которых состоит из 10 линий СТС. Соотношения интенсивностей и значение констант расщепления 5,20 Э дают основания предполагать, что спектр соответствует анион-радикалу ксантотрицина, который образуется из реумицина в реакционной системе путем трансметилирования диметилформамидом.

Таким образом, в ряду антибиотиков (I)–(IV) наиболее легко на ртутном катоде в диметилформамиде восстанавливается ксантотрицин (III); он дает наиболее стабильные анион-радикалы, и его $E_{1/2}^I$ сдвинут в положительную область по сравнению с реумицином (I) на 0,31 В, а по сравнению с метилированным енолом реумицина (IV) — на 0,48 В. Наименее устойчивые анион-радикалы образуются при восстановлении реумицина (I), и их концентрация столь мала, что не удается зарегистрировать спектр ЭПР. Полученные результаты подтверждают предположение о связи биологического действия и токсичности изученных антибиотиков с их электроноакцепторными свойствами. Наиболее сильными биологическими свойствами и в то же время наибольшей токсичностью обладает ксантотрицин (III), который является и самым сильным акцептором электронов в ряду исследованных соединений. Ослабление электроноакцепторных свойств у антибиотиков в ряду (I), (II), (IV) приводит к большей избирательности биологического действия, например противоопухолевой активности, и к уменьшению токсичности.

Экспериментальная часть

В работе использовали химически чистый реумицин, выпускаемый заводом Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков для клинического изучения.

Антибиотики (II)–(IV) получали по описанной ранее методике метилированием реумицина эфирно-метанольным раствором diazometана [1].

Исследуемые препараты имели физико-химические характеристики, приведенные в работе [1].

Полярограммы регистрировали для $5 \cdot 10^{-4}$ М растворов исследуемых антибиотиков (I—IV) в диметилформамиде, содержащем в качестве фонового электролита 0,1 М раствор перхлората тетра-*n*-бутиламмония. Методики полярографических измерений и характеристики растворов приведены в работе [9].

Спектры ЭПФ регистрировали на радиоспектрометрах РЭ 1301 и РЭ 1306. Электрохимическое получение анион-радикалов осуществлялось в ячейке, помещенной в резонатор спектрометра при комнатной температуре по методике, описанной в работе [9]. Концентрации веществ составляли $(1-3) \cdot 10^{-3}$ М.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Esipov S. E., Kolosov M. N., Saburova L. A.* The structure of reumycin.— *J. Antibiot.*, 1973, v. 26, № 9, p. 537—538.
2. *Eble T. E., Olson E. C., Large C. M., Shell J. W.* Fervenulin, a new crystalline antibiotic. II. Isolation and characterization.— *Antibiotics Ann.*, 1961, v. 1959/60, p. 227—229.
3. *Machlowitz R. A., Fischer W. P., McKay B. D., Tytell A. A., Charney J.* Xanthothricin, a new antibiotic.— *Antibiotics and Chemotherapy*, 1954, v. 4, № 3, p. 259.
4. *Akimenko V. K., Golovchenko N. P., Medentsev A. G., Esipov S. F.* Effect of xanthothricin on respiratory chain.— *FEBS Lett.*, 1974, v. 46, № 1, p. 23—28.
5. *Акименко В. К., Головченко Н. П., Есинов С. Е., Сабурова Л. А., Терентьева Т. Г.* Сравнительное изучение биологической активности антибиотиков реумицина, фервенулина, 7-метоксиреумицина и ксантотрицина.— В сб.: Противопухольевые антибиотики. Советско-Итальянский симпозиум. М.: 1975, с. 238—251.
6. *Wolrab H., Degn H.* Retarded reduction of cytochrome b_5 following the aerobic-anaerobic transition of intact rat liver mitochondria (BBA 46251).— *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 256, № 2, p. 216—222.
7. *Latuazan H. E., Berends W.* On the origin of the toxicity of toxoflavin.— *Biochim. et biophys. acta*, 1961, v. 52, № 4, p. 502—508.
8. *Коган А. Х., Чернов В. А., Сивянская Г. П., Минакова С. М., Демуров Е. А., Ефуди С. Н.* Экспериментальное исследование нового принципа химиотерапии рака путем превращения опухолевых клеток в анаэробоподобные клетки, не переносящие активный кислород.— В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Матер. Всес. совещания. Черногоровка: 1980, т. II, с. 113—117.
9. *Yoneda F., Nagamatsu T.* Transmethylation from toxoflavines to nucleophiles.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, № 17, p. 5735—5737.
10. *Казакова В. М., Минина Н. Е., Макаров И. Г., Писков В. Б.* Анион-радикалы различных производных мета-динитробензола. I. 1,3-Динитро-4-метил-5-карбамоилбензол (кокцидин), некоторые его изомеры и аналоги.— *Ж. структурн. химии*, 1976, т. 17, № 4, с. 615—619.

Поступила в редакцию
17.II.1981

RADICAL ANION GENERATION FROM ANTIBIOTICS OF PYRIMIDO [5,4-e]-1,2,4-TRIAZINE GROUP

KAZAKOVA V. M., MAKAROV I. G., MININA N. E.,
ESIPOV S. E., CHERNYSHEV A. I.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
All-Union Institute of Antibiotics, Moscow*

Radical anions are obtained by electrochemical reduction of the antibiotics belonging to the [5,4-e]-1,2,4-triazine group, namely fervenulin, reumycin methyl-enol, and xanthothricin. EPR spectra of the radical anion are indicative of the unpaired electron delocalization in the triazine fragment.