

Н. Е. Щепина*, **В. В. Аврорин^а**, **Г. А. Бадун^б**, **Г. А. Александрова,**
С. Е. Уханов^в, **В. М. Федосеев^б**, **С. Б. Льюис^г,**
И. И. Бойко^д

**ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ N-ФЕНИЛЗАМЕЩЕННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОЛИНА В РЕЗУЛЬТАТЕ
ЯДЕРНО-ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА**

Для получения труднодоступных N-фенилзамещенных производных хинолина, меченных тритием, предложен ядерно-химический метод синтеза. В основе синтеза лежат ион-молекулярные реакции свободных фенил-катионов, генерируемых при β -распаде трития, с нуклеофильными центрами гетероциклических соединений. Синтезированные ониевые производные обладают существенной ингибирующей противомикробной активностью и являются перспективными для детального изучения механизмов реакций и процессов метаболизма с помощью радиоактивных индикаторов.

Ключевые слова: соли N-фенилхинолина и хинальдиния, тритий, фенил-катионы, шестичленные азотистые гетероциклические соединения, ядерно-химический синтез.

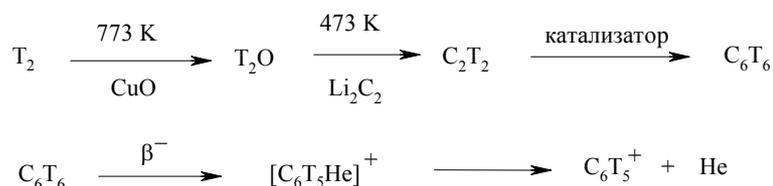
Фрагменты хинолина и изохинолина являются частью многих алкалоидов и энзимов. Наряду с природными терапевтическими препаратами, такими как хинин и папаверин, разработано большое количество эффективных синтетических лекарств: хлороксин, ципрофлоксацин, норфлоксацин и т. д. [1–3]. Большой вклад в разработку методов синтеза и изучения биологической активности производных хинолина был сделан советскими учеными [4, 5]. При биологическом мониторинге было установлено, что липофильные производные четвертичного азота, а именно, соли хинолина, проявляют более высокую биологическую активность. Причем, N-фенильные соединения во многих случаях превосходят свои алифатические аналоги. Несмотря на большое количество работ и обширные аспекты биологического и медицинского применения (антисептики, биоциды, противомалярийные, противораковые, антирецидивные и жаропонижающие препараты) [6–14], и по сей день идет поиск новых биологически активных соединений в области производных хинолина [15–26].

В настоящее время для детального изучения механизма действия лекарственных средств, а также процессов их метаболизма в организме широко используется метод изотопной, особенно тритиевой метки [27–29], позволяющий проводить очень чувствительные исследования биологических молекул и фармпрепаратов. К сожалению, синтез сложных биологически активных объектов с фиксированной тритиевой меткой является крайне сложным и трудоемким.

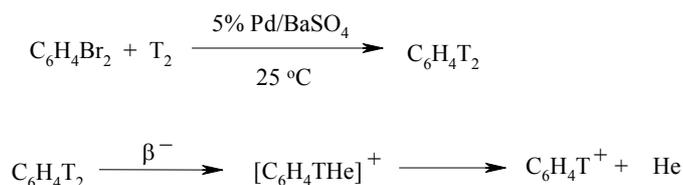
Прямые методы фенилирования азота в производных пиридина отсутствуют [30]. Только в середине XX века были впервые получены

четвертичные соли хинолиния в результате циклизации вторичных аминов с различными карбонилсодержащими органическими соединениями по реакции Скраупа и Дебнера–Миллера [2, 31–35]. Мечеными тритием предшественниками для этой реакции являются коммерчески недоступные дифениламин, анилин или нитробензол, которые содержат тритий в бензольном кольце, что приводит к необходимости многостадийного синтеза данных соединений. Крайняя сложность традиционной схемы получения, а также значительные потери радиоактивности за счет разбавления и водородного обмена при таком многостадийном синтезе делают этот путь трудно выполнимым и крайне дорогостоящим.

Большие перспективы в синтезе меченных тритием гетероциклических соединений открывает ядерно-химический метод, заключающийся в прямом одностадийном фенилировании атома азота гетероцикла свободными фенил-катионами, генерируемыми при самопроизвольном β^- -распаде трития в составе меченого тритием бензола. Источник фенил-катионов – меченный тритием бензол может быть синтезирован из молекулярного трития в результате следующих реакций [36].



Поскольку для изучения ион-молекулярных реакций фенил-катионов, генерируемых ядерно-химическим методом, необходимо наличие двойной метки в молекуле бензола, мы от более трудоемкого синтеза многократно меченого бензола перешли к более простому и удобному синтезу двукратно меченого бензола – источника фенил-катионов. В основу синтеза двукратно меченого бензола была положена реакция каталитической замены атомов галогена тритием в молекуле *n*-дибромбензола [37]:

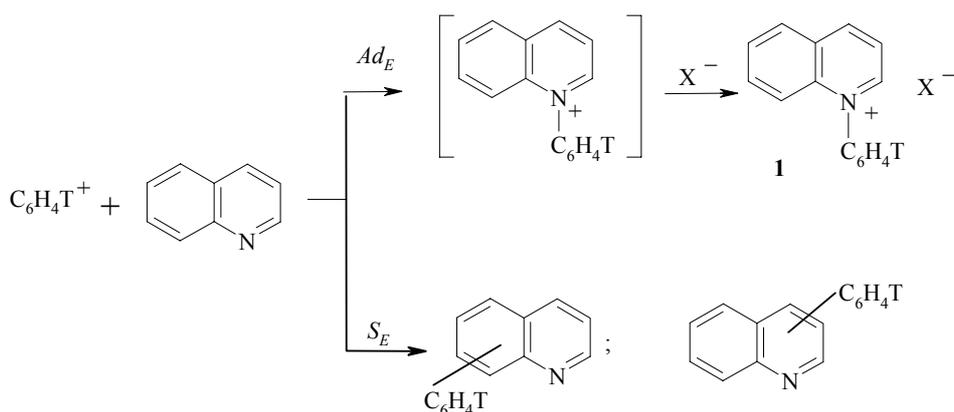


Данный метод получения фенил-катионов имеет ряд существенных преимуществ:

- 1) полученные фенил-катионы являются "свободными", т. е. не имеют противоиона;
- 2) фенил-катионы достаточно устойчивы, поскольку образуются в матрицах атомов гелия (твёрдая фаза);
- 3) ион-молекулярные реакции протекают на поверхности стабилизированной соли в отсутствие растворителя;

4) реакции протекают в мягких условиях, поскольку процессы β -распада не зависят от температуры, давления и т. п.

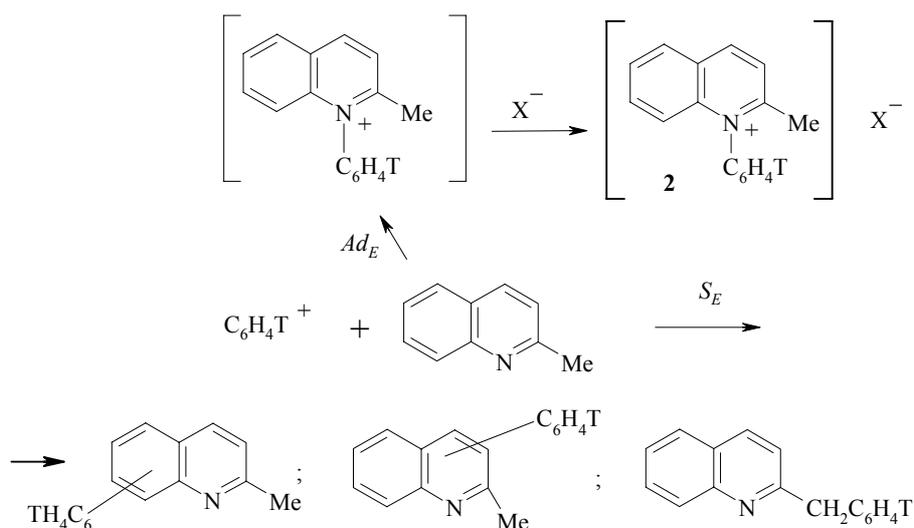
Характерной особенностью генерируемых фенил-катионов являются их последующие ион-молекулярные реакции с исследуемыми нуклеофилами. При взаимодействии фенил-катионов с хинолином реакция электрофильного присоединения происходит по неподеленной электронной паре атома азота (образование хинолиниевых солей), а также реакции электрофильного замещения по бензольному и гетероциклическому кольцу:



В случае же хинальдина наличие метильной группы ведет к дополнительному реакционному центру и, как следствие, к дополнительной реакции с образованием бензильных производных хинолина.

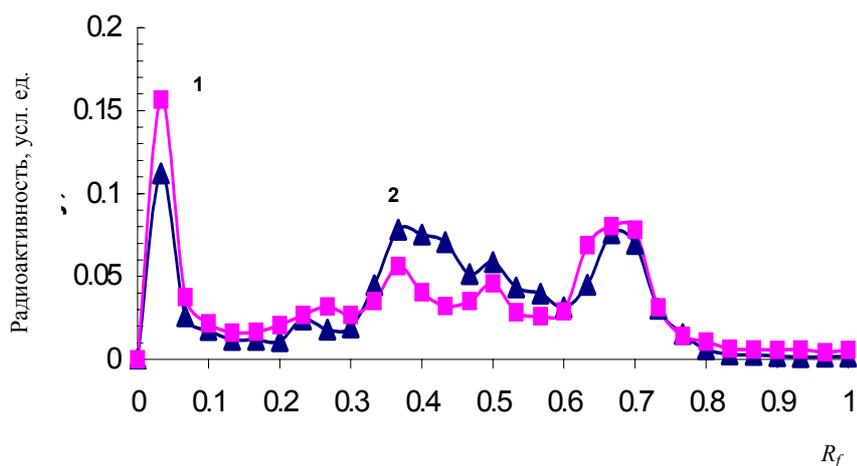
Ион-молекулярные реакции осуществляются в запаянных ампулах, содержащих тритированный бензол (источник фенил-катионов) и субстраты – хинолин или хинальдин, которые нанесены на кристаллы стабилизирующей соли. Ампулы с реакционной смесью выдерживают для накопления продуктов реакции в количествах, достаточных для их надежного определения (не менее 1 мес). После накопления ампулу вскрывают и проводят анализ меченных тритием продуктов реакции. На рисунке представлено распределение радиоактивности меченных тритием продуктов реакции. Первые пики относятся к солям хинолиния и хинальдиния. Выход производных N-фенилхинолиния (**1**) $21 \pm 3\%$, N-фенилхинальдиния (**2**) $18 \pm 3\%$. Остальные пики относятся к продуктам электрофильного замещения, причем наблюдается значительное соответствие (см. рисунок) хроматографического поведения полученных меченных продуктов реакции в случае хинолина и 2-метилхинолина.

Бензаннелирование при переходе от пиридина к хинолину сопровождается уменьшением основности последнего приблизительно на 0.3 pK_a [38]. При сравнении же результатов ион-молекулярных реакций нами было обнаружено значительное понижение выходов продуктов реакции



присоединения по азогруппе в случае бензохинолинов (выход производных N-фенилпиридиния составлял более 60%) [39]. В случае хинальдина картина еще усложняется наличием метильного заместителя в гетероароматическом кольце. Хотя и известно, что донорные заместители увеличивают основность пиридинового азота [2, 31, 33–35, 38], тем не менее, для 2-замещенных пиридинов, так же как и для 2-R-хинолинов обнаружен так называемый "аномальный" электронный эффект [40, 41].

Природа этого явления окончательно не выяснена, но оно свидетельствует о превалировании индукционного эффекта, действие которого на расстоянии одной связи от азогруппы весьма значительно. В наших исследованиях, вероятно, подобный эффект приводит к некоторому небольшому уменьшению выхода N-фенилхинальдиниевого производного по сравнению с хинолиниевым.



Распределение радиоактивности меченных тритием соединений в случае ион-молекулярных реакций с хинолином и хинальдином

Подобно α - и γ -пиколинам метилхинолины, содержащие метильную группу в *орто*- и *пара*-положениях по отношению к гетероатому, способны выступать в реакциях в качестве СН-активного компонента. К сожалению, в силу отсутствия коммерчески доступных соединений и того, что неактивные синтезы фенилзамещенных хинолинов являются крайне труднодоступными, точное соотнесение всех пиков на радиохроматограмме в настоящий момент является затруднительным.

Было исследовано противомикробное действие неактивных носителей – перхлоратов N-фенилхинолиния и N-фенилхинальдиния.

Данные соединения проявили ингибирующее действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий в интервале $< 1000.0 > 500.0$ мкг/мл, а бактерицидный эффект отмечен в концентрации 1000.0 мкг/мл в отношении обоих видов микроорганизмов.

Таким образом, благодаря применению ядерно-химического метода разработан простой способ синтеза труднодоступных биологически активных солей хинолиния и хинальдиния, меченных тритием. Новые соединения представляют интерес в качестве радиоактивных индикаторов для изучения механизма действия биологически активных соединений, потенциальных лекарственных средств.

Наличие радиоактивной метки позволяет получить новые данные по механизмам протекающих электрофильных реакций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Свидетели и носители – неактивные производные N-фенилхинолиния и хинальдиния были синтезированы по известным методикам [35, 42–44]. Перхлорат N-фенилхинолиния, т. пл. 156–157 °С (т. пл. 155–156 °С [42] и 157 °С [43]), перхлорат N-фенилхинальдиния, т. пл. 159–160 °С (т. пл. 159–160 °С [35] и 160 °С [44]).

Радиохроматографию полученных тритированных соединений осуществляют на стеклянных пластинках *Reverse Phase C18 silica gel (Fluorescent Indicator)* в ацетонитриле. Участки адсорбционного слоя хроматограммы по 0.5 см длиной счищают в диоксидный сцинтиллятор и проводят измерение их радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика *Rack-beta* (США).

Двукратно меченный тритием бензол. Смесь 5 мг дибромбензола, 6.5 мкл триэтиламина в 0.5 мл гексана и 5 Ки газообразного трития гидрируют на катализаторе 5% Pd/BaSO₄ в течение 1 ч при комнатной температуре, получают раствор в гексане двукратно меченного тритием бензола химической чистоты не менее 99%. Объемная удельная активность полученного раствора составила 4 Ки/мл.

Синтез N-фенилхинолиниевых солей (I). В стеклянную ампулу объемом 0.5 мл вносят кристаллы стабилизирующей соли (KBF₄, KClO₄, KI), затем 6.5 мкл (0.055 ммоль) хинолина и при охлаждении ампулы жидким азотом добавляют 1 мкл (0.011 ммоль) C₆H₄T₂. Ампулу запаивают и выдерживают 1–2 мес для накопления продуктов ядерно-химического синтеза. Ампулу вскрывают, содержимое переносят в специальную виалу, добавляют 0.5 мл бензола и 0.5 мл ацетонового раствора носителя – неактивной соли N-фенилхинолиния (1 мг/мл). Непрореагировавший тритированный бензол отгоняют в вакууме. К сухому остатку добавляют 0.5 мл ацетона и отбирают пробы по 5 мкл для разделения меченых соединений методом ТСХ.

Синтез N-фенилхинальдиниевых производных (2). Аналогично осуществляют ядерно-химический синтез производных хинальдина. Ампула содержит 1 мкл (0.011 ммоль) тритированного бензола и 7.4 мкл (0.055 ммоль) хинальдина.

Определение противомикробной активности

Для проведения экспериментов готовили исходные разведения микробных тел по оптическому стандарту из суточной агаровой культуры. Микробная нагрузка соответствовала $2.5 \cdot 10^5$ микробных тел в 1 мл. Микробную взвесь вносили в приготовленные разведения препаратов в питательной среде. Результаты регистрировали после 20 ч и 7 сут термостатирования при 37 °С. Противомикробную: бактериостатическую (МИК) и бактерицидную (МБК) активность оценивали по минимально действующей концентрации. Максимально испытанные концентрации новых соединений соответствуют 1000 мкг/мл.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 07-03-00881.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. F. Pozharskii, A. T. Soldatenkov, A. R. Katritzky, *Heterocycles in Life and Society*, Wiley, New York, 1997.
2. J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*; 4th Ed., Blackwell Science, 2000.
3. *Chemistry of Organic Fluorine Compounds*; II ACS Monograph 187, Washington DC, 1995.
4. Г. Е. Пилюгин, Б. М. Гуцуляк, *Успехи химии*, **32**, 167 (1963).
5. И. И. Сидорчук, Р. Ф. Стаднийчук, Е. Н. Тищенко, Л. Т. Бордяковская, *Хим. фарм. журн.*, **12**, 78 (1978).
6. W. A. Cox, *Applied Microbiology*, **13**, 956 (1965).
7. B. K. Sinha, R. M. Philen, R. Sato, R. L. Cysyk, *J. Med. Chem.*, **20**, 1528 (1977).
8. J. W. Bunting, K. R. Laderoute, D. J. Norris, *Can. J. Biochem.*, **58**, 49 (1980).
9. S. M. Taylor, C. Stubbley-Beedman, J. G. P. Stell, *UK Biochem. J.*, **220**, 67 (1984).
10. C. Beedham, S. E. Bruce, D. J. Critchley, Y. Al-Tayib, D. J. Rance, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **12**, 307 (1987).
11. G. A. Atwell, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, **32**, 396 (1989).
12. S. A. Rotenberg, S. Smiley, M. Ueffing, R. S. Krauss, L. B. Chen, B. Weinstein, *Cancer Res.*, **50**, 677 (1990).
13. D. J. P. Critchley, D. J. Rance, C. Beedham, *Biophys. Res. Commun.*, **185**, 54 (1992).
14. J. Stojan, V. Marcelb, D. Fournierb, *Chem.-Biol. Interactions*, **119–120**, 147 (1999).
15. M. Malik-Hal, R. Ganellin, D. Galanakis, D. H. Jenkinson, *Brit. J. Pharmacol.*, **129**, 1431 (2000).
16. C. R. Joaquin, D. Galanakis, A. Piergentili, K. Bhandari, C. R. Ganellin, P. M. Dunn, D. H. Jenkinson, *J. Med. Chem.*, **43**, 420 (2000).
17. C. Pina-Vaz, F. Sansonetty, A. G. Rodrigues, S. Costa-Oliveira, C. Tavares, J. Martinez-de-Oliveira, *Clin. Microbiol. Infection*, **7**, 609 (2001).
18. S. Jayaraman, Y. Song, V. L. Shankar, A. S. Verkman, *J. Clin. Invest.*, **107**, 317 (2001).
19. K. A. Marr, M. Koudadoust, M. Black, S. A. Balajee, *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**, 1240 (2001).
20. O. Kogi, H.-B. Kim, N. Kitamura, *Analyst*, **127**, 967 (2002).
21. P. K. Mukherjee, J. Chandra, D. M. Kuhn, M. A. Ghannoum, *Infection Immunity*, **71**, 4333 (2003).

22. T. N. Bennett, M. Paguio, B. Gligorijevic, C. Seudieu, A. D. Kosar, E. Davidson, P. D. Roepe, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1807 (2004).
23. R. M. Abd El-Aala, M. Younis, *Bioorg. Chem.*, **32**, 193 (2004).
24. M. Otarigi, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 309 (2005).
25. U.-C. Hipler, P. Elsner, J. W. Fluhr, *Curr. Probl. Dermatol.*, **33**, 165 (2006).
26. C.-H. Lee, H. J. Kim, J.-H. Lee, H.-J. Cho, J. Kim, K. C. Chung, S. Jung, *J. Biol. Chem.*, **281**, 3463 (2006).
27. M. Saljoughian, *Synthesis*, 1781 (2002).
28. Г. В. Сидоров, Н. Ф. Мясоедов, *Успехи химии*, **13**, 398 (1999).
29. В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Н. Ф. Мясоедов, *Меченные тритием липофильные соединения*, Наука, Москва, 2003.
30. K. N. Pausacker, *Austr. J. Chem.*, **11**, 200 (1958).
31. В. И. Иванский, *Химия гетероциклических соединений*, Высшая школа, Москва, 1978, с. 459.
32. C. Mortelmans, G. Van Binst, *Tetrahedron*, **34**, 363 (1978).
33. Т. Джилкрист, *Химия гетероциклических соединений*, Москва, 1996.
34. A. R. Katritzky, A. F. Pozharski, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Pergamon, 2000.
35. Г. Т. Пилюгин, З. Я. Крайнер, *ДАН*, **81**, 609 (1951).
36. В. Д. Нефедов, Е. Н. Синотова, М. В. Корсаков, Е. Г. Алексеев, *Радиохимия*, **15**, 635 (1973).
37. Н. Е. Щепина, В. В. Аврорин, Г. А. Бадун, В. М. Федосеев, С. Е. Уханов, С. Б. Льюис, *Радиохимия*, **49**, 551 (2007).
38. А.Ф. Пожарский, *Теоретические основы химии гетероциклов*, Химия, Москва, 1985.
39. В. Д. Нефедов, М. А. Торопова, В. В. Аврорин, Д. С. Гембицкий, С. Б. Льюис, Б. Мэттсон, *Радиохимия*, **41**, 523 (1999).
40. M. Charton, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2033 (1964).
41. M. Charton, *J. Org. Chem.*, **30**, 3341 (1965).
42. Р. Ф. Стаднийчук, Г. Т. Пилугин, О. Е. Петренко, *ЖОХ*, **40**, 1834 (1970).
43. Б. И. Ардашев, В. И. Минкин, *ЖОХ*, **29**, 200 (1959).
44. М. И. Роговик, И. Н. Черняк, Ю. С. Розум, Г. Т. Пилюгин, *ЖОХ*, **34**, 3320 (1964).

Естественно-научный институт
Пермского государственного университета,
Пермь 614990, Россия
e-mail: neshcherina@mail.ru

Поступило 26.02.2008

^aСанкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург 199034, Россия
e-mail: radiochem@yandex.ru

^bМосковский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва 119991, Россия
e-mail: badun@radio.chem.msu.ru

^вПермский государственный технический
университет, Пермь 614600, Россия

^гУниверситет Дж. Мэдисона, Харрисонбург, США
e-mail: lewissb@jmu.edu

^аООО "Технолог", Переславль-Залесский 152025,
Ярославская обл., Россия
e-mail: technolog@slavich.ru