



На правах рукописи

ТРОФИМОВ Дмитрий Геннадьевич

**НОВЫЕ СТЕРИЧЕСКИ ЗАТРУДНЁННЫЕ
НИТРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ ИЗ 4*N*-ИМИДАЗОЛ-
3-ОКСИДОВ**

(02.00.03. – органическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском Институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Кириллюк Игорь Анатольевич
ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирское отделение Российской академии наук, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Просенко Александр Евгеньевич
ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»,
заведующий кафедрой химии.

кандидат химических наук
Толстикова Святослав Евгеньевич
ФГБУН Институт «Международный томографический центр» Сибирского
отделения Российской академии наук, научный сотрудник.

Ведущая организация: ФГБУН Институт проблем химической физики РАН

Защита состоится «23» июня 2016 г. в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д003.049.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 9, НИОХ СО РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук и на сайте по адресу: <http://web.nioch.nsc.ru>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.ed.gov.ru/>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 9, ученому секретарю диссертационного совета Д003.049.01; e-mail: dissovet@nioch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» __ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук, профессор



Шульц Эльвира Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Нитрокислые радикалы (НР) – самый распространённый и развитый в синтетическом отношении класс стабильных органических радикалов. Эти соединения нашли разнообразное применение в различных областях науки и техники. Важнейшая область применения НР – спиновые зонды и метки – полезные молекулярные инструменты для исследования сложных молекулярных систем (в том числе биологических) с помощью ЭПР, позволяющие определять (измерять, исследовать) многие важные параметры и свойства.

Отдельную группу среди спиновых зондов и меток представляют НР, спектральные характеристики которых чувствительны к рН. Кислотность среды (рН) является одним из важнейших, часто измеряемых параметров в биологии, биофизике, медицине. Изменения рН могут служить признаком развития в организме различных патологий, таких как ишемия, инфекции, воспаления, опухоли и др. Значение межклеточной кислотности (рН) играет существенную роль в процессе возникновения опухоли, ее росте и терапии. Локальные значения рН на поверхности биологических мембран биомолекул позволяют судить об электростатических потенциалах поверхностей и исследовать процессы переноса протона, ответственные за энергетику клетки, и механизмы взаимодействия биомолекул. Кислотность на поверхности материалов (катализаторов, сорбентов и др.) во многих случаях – фактор, определяющий свойства. Актуальность работ, направленных на синтез новых, более совершенных, спиновых меток и зондов, не вызывает сомнений. Биогенные антиоксиданты и ферментативные системы живых организмов, как правило, быстро восстанавливают подавляющее большинство нитрокислых радикалов в диамагнитные гидроксиламины, не имеющие сигналов в спектре ЭПР. Из всех известных рН-чувствительных спиновых зондов в биофизических исследованиях чаще всего используются 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксиды, обладающие высокой чувствительностью спектра ЭПР к изменениям кислотности в физиологически важном диапазоне (рН 6 ÷ 8). Однако нитрокислые радикалы этого типа не отличаются высокой устойчивостью к восстановлению. Для решения этой проблемы необходимо введение объёмных заместителей в ближайшее окружение радикального центра. Такие нитрокислые радикалы менее реакционноспособны, что повышает их стабильность, в частности, по отношению к биогенным восстановителям, и, следовательно, увеличивает время жизни радикалов в биологических системах, однако, подавляющее большинство известных на сегодняшний день нитрокислых радикалов этого ряда содержит объёмные неполярные заместители в окружении нитрокислой группы и, вследствие этого, малорастворимы в воде и не могут быть ковалентно связаны с биомолекулами.

Указанная выше задача введения гидрофильных фрагментов родственна проблеме создания рН-чувствительных спиновых меток, т.е., НР, способных ковалентно пришиваться к биологическим молекулам или к поверхностям, сохраняя чувствительность спектра к рН. Наличие в структуре 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксидов фрагментов, способных к реакциям с

алкилирующими или ацилирующими агентами, затрудняет введение активных функциональных групп. Внутримолекулярные реакции в таких производных, как правило, преобладают над межмолекулярными и приводят к существенному изменению или потере функциональных свойств (чувствительности к pH). Одним из результатов этого является использование спиновых меток с далёкой от физиологических значений областью чувствительности к pH в недавних биофизических работах просто потому, что более подходящих спиновых меток до недавнего времени не было.

Цель работы.

Целью диссертационной работы была разработка методов синтеза новых производных 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксилов, содержащих функциональные группы, способные обеспечивать ковалентное связывание с биологическими молекулами, либо с поверхностями различных материалов, проявляющих высокую чувствительность к pH в заданном диапазоне (в особенности, в области около 7) и отличающихся высокой устойчивостью к восстановлению в биологических образцах.

Научная новизна.

В результате проделанной работы выявлены ограничения последовательности "введение 4-пентенильного фрагмента – внутримолекулярное 1,3-диполярное циклоприсоединение – раскрытие изоксазолидинового цикла – окисление" для синтеза пространственно-затруднённых нитроксильных радикалов: показано, что 4,4-диметил-2-(пент-4-енил)-5-фенил-4*H*-имидазол-3-оксид легко претерпевает внутримолекулярное 1,3-диполярное циклоприсоединение, а последующие восстановительное раскрытие изоксазолидинового цикла и окисление позволяют получать нитроксильный радикал со спиро-(2-гидроксиметил)-циклопентановым фрагментом в положении 2 гетероцикла, а для 4,4-диэтильного производного не удаётся добиться удовлетворительной конверсии в реакции внутримолекулярного 1,3-диполярного циклоприсоединения, по-видимому, из-за обратимости этой реакции и параллельно протекающего дезоксигенирования исходного нитрона. Показано, что присоединение реактива Гриньяра к 5,5-диалкиламино-4*H*-имидазол-3-оксидам позволяет получать гидрофильные производные 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксила, содержащие гидроксигруппы, 1,3-диоксолановый или терминальный этиленовый фрагмент в боковой цепи в положении 2 гетероцикла или при экзоциклическом атоме азота амидиновой группировки. Разработаны удобные методы химической модификации этих групп с сохранением нитроксильного фрагмента и амидиновой группировки, позволившие получить разнообразные функциональные производные. Показано, что присоединение активной алкилирующей группы к 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксидам через жёсткий *para*-фениленовый фрагмент позволяет избежать внутримолекулярного алкилирования амидиновой группировки и обеспечивает устойчивость спиновых меток.

Практическая значимость. Синтезирован большой набор новых нитроксильных радикалов ряда 4-амино-2,5-дигидроимидазола, в том числе, водорастворимые производные, спектры ЭПР которых отличаются высокой

чувствительностью к изменениям кислотности в диапазоне pH 6 ÷ 8. На основе этих радикалов синтезированы гидрофильные спиновые зонды и спиновые метки, способные ковалентно связываться с биомолекулами. Впервые синтезирован гидрофильный спиновый зонд, пригодный для мониторинга изменений pH в тканях живых организмов *in vivo* и *ex vivo*, в частности, в сердечной мышце в условиях ишемии-реперфузии и в раковых опухолях. Впервые синтезированы спиновые метки, отличающиеся высокой чувствительностью в широком диапазоне pH 1 ÷ 6. Полученные новые соединения успешно используются в исследованиях, проводимых коллегами из Университета штата Огайо, Коламбус, США; Университета штата Северная Каролина, США; УрФУ.

Апробация работы.

Основные результаты обсуждены на Объединенном семинаре НИОХ СО РАН; отдельные части диссертационного исследования были представлены на российских и международных конференциях, в т.ч. VII International Conference on Nitroxide Radicals (SPIN – 2014), Zelenogradsk, Kaliningrad region, Russia, 14–20 September, 2014, International Congress of Young Chemists YoungChem 2012, Gdansk, Poland, 10–14 October 2012; Current Topics in Organic Chemistry, Novosibirsk, Russia, June 6–10, 2011.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых базами данных Web of Science и Scopus; тезисы 16 докладов.

Структура и объём диссертации.

Работа изложена на 161 странице машинописного текста, содержит 102 схемы, 14 рисунков, 7 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы и приложения. Содержит список используемых обозначений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность темы, показаны научная новизна и практическая значимость, выбор объектов и цель исследования.

Первая глава является обзором литературных данных, в которой обобщены сведения о взаимодействии нитронов с металлоорганическими реактивами, в том числе функционально-замещёнными, особенностям регио- и стереоселективности этих превращений, а также направлениям последующей функционализации.

Вторая глава – обсуждение полученных результатов синтеза нитроксильных радикалов ряда имидазолина через внутримолекулярное 1,3-диполярное циклоприсоединение в производных 4*H*-имидазол-3-оксида.

Третья глава – обсуждение полученных результатов синтеза нитроксильных радикалов имидазолинового ряда с различными функциональными группами в положении 2 гетероцикла.

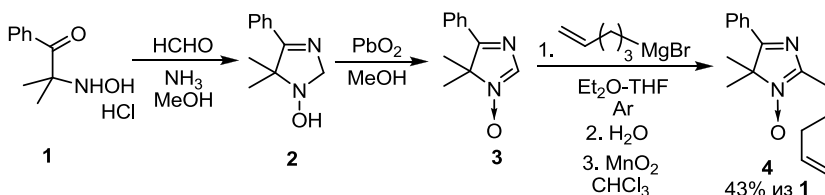
Четвёртая глава – обсуждение полученных результатов синтеза нитроксильных радикалов имидазолинового ряда с различными функциональными группами при экзоциклическом атоме азота амидиновой группировки.

В **экспериментальной части** представлены данные по использованным материалам, оборудованию, методикам проведения синтеза соединений, данные ЯМР, УФ-, ИК-спектров, температуры плавления и данные элементного анализа.

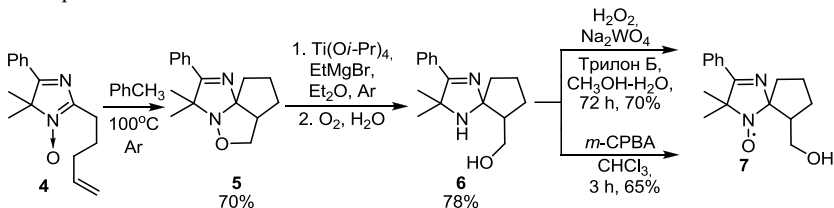
Приложение содержит кривые титрования синтезированных НР и вид двумерного спектра ЯМР ^1H – ^{13}C корреляции на константах ближнего взаимодействия циклоаддукта **5**.

СИНТЕЗ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ РЯДА ИМИДАЗОЛИНА ЧЕРЕЗ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ 1,3-ДИПОЛЯРНОЕ ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЕ В ПРОИЗВОДНЫХ 4*H*-ИМИДАЗОЛ-3-ОКСИДА.

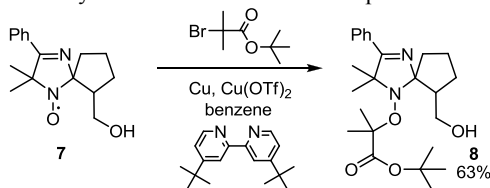
Возможность использования последовательности "введение пент-4-енильного фрагмента – внутримолекулярное 1,3-диполярное циклоприсоединение – раскрытие изоксазолидинового цикла – окисление" для синтеза нитроксильных радикалов из 4*H*-имидазол-3-оксидов была изучена на примере модельного нитрона **3**, синтез которого был описан ранее. Взаимодействие альдонитрона **3** с пент-4-енилмагнибромидом с последующим гидролизом и окислением приводит к образованию алкенилнитрона **4**.



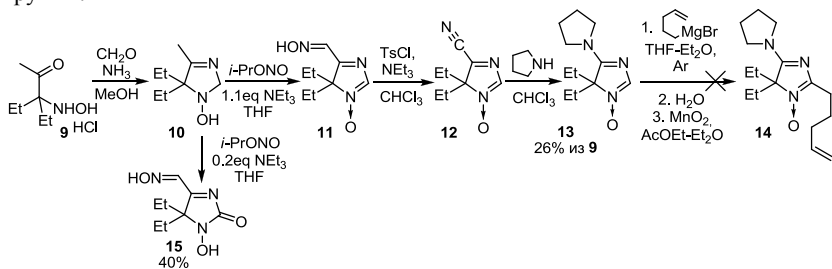
При нагревании алкенилнитрона **4** до $\sim 100^\circ\text{C}$ в толуоле в атмосфере аргона образуется циклоаддукт **5**, который затем раскрывали с помощью LVT-реагента. Полученный аминоспирт **6** легко окисляется в соответствующий нитроксильный радикал перекисью водорода в присутствии вольфрамата, либо *m*-хлорнадбензойной кислоты.



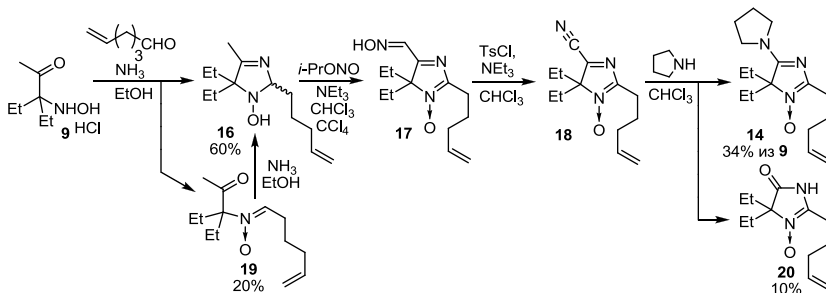
НР **7** представляет интерес в качестве регулятора радикальной полимеризации, поэтому на его основе был синтезирован алкоксиамин **8**.



Таким образом, принципиальная возможность синтеза НР со спиро-(2-гидроксиметил)-циклопентановым фрагментом в положении 2 была нами показана. Для синтеза пространственно-затруднённого производного был использован гидросиламинокетон **9**. Конденсацией гидросиламинокетона **9** с формальдегидом и аммиаком в метаноле был получен имидазолин **10**. Взаимодействие имидазолина **10** с изопропилнитритом может проходить по-разному в зависимости от количества основания (триэтиламина). В присутствии 1.1 эквивалента триэтиламина образуется оксим **11**, а использование небольшого количества основания приводит к окислению альдонитронной группы.

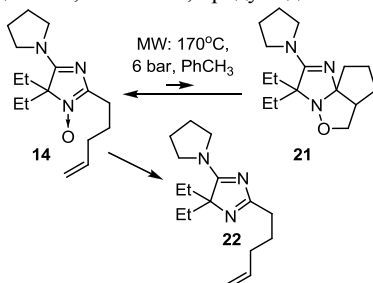


Бекмановское расщепление оксима **11** даёт нитрил **12**, в котором цианогруппа последовательно сопряжена с иминной и нитронной, что позволяет замещать её действием различных нуклеофилов. Реакцией нитрила **12** с пирролидином с выходом 40% был получен амидин **13**, обработка которого пент-4-енилмагнийбромидом с последующим гидролизом и окислением приводит к сложной смеси трудноразделимых продуктов, из которой не удалось выделить алкенилнитрон **14**. Поэтому для синтеза соединения **14** нами был использован другой метод:



Однако при взаимодействии гидросиламинокетона **9** с гекс-5-еналем и водным аммиаком в метаноле была получена смесь гидросиламина **16** (60%) и ациклического нитрона **19**, который количественно превращается в имидазолин **16** при выдерживании его в насыщенном спиртовом растворе аммиака. Имидазолин **16** обрабатывали изопропилнитритом в присутствии триэтиламина, а полученный оксим **17** расщепляли по Бекману. При добавлении к нитрилу **18** избытка пиirroлидина в хлороформе основным продуктом реакции является амидин **14**. Причиной образования побочного продукта – амида **20** – видимо, является наличие следов воды в хлороформе или пиirroлидине.

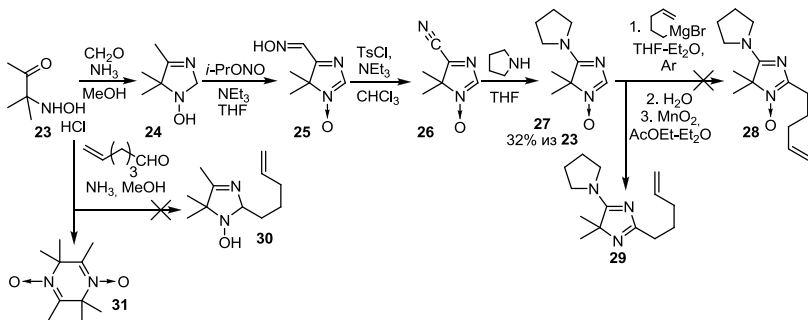
Нагревание раствора амидина **14** в толуоле в микроволновой печи до 165°C при 6 бар в течение 5 минут не приводит к накоплению циклоаддукта **21**, а при нагревании того же раствора в более жёстких условиях происходит частичное осмоление реакционной массы и образуется сложная смесь продуктов, из которой с помощью колоночной хроматографии был выделены исходный амидин **14**, а также ещё одно соединение, спектр ПМР которого близок к спектру амидина **14**, возможно, продукт дезоксигенирования **22**.



В спектрах ПМР реакционных масс имеются сигналы, вероятно, относящиеся к циклоаддукту **21**: равные по интенсивности триплеты неэквивалентных метильных групп при 0.95 и 1.04 м.д., а также мультиплеты при 3.99, 3.24 и 2.82 м.д., близкие по положению и форме к сигналам атомов водорода CH₂O-фрагмента и метинового атома водорода в циклопентановом цикле в аналогичных трициклических структурах. Низкое содержание этого циклоаддукта в реакционной массе не позволило выделить в индивидуальном виде. Возможным объяснением наблюдаемых особенностей этой реакции является обратимость

образования циклоаддукта **21**. Примеры обратимости таких циклизаций обнаружены на других объектах.

По-видимому, этильные группы в положении 4 соединения **14** делают образование напряжённого циклоаддукта **21** невыгодным, смещая равновесие в сторону исходного нитрона. Для проверки этого предположения мы попытались получить аналогичный алкенилнитрон **28**, содержащий метильные группы, эффективный объём которых меньше этильных, что понижает стерические затруднения.



По литературной методике был синтезирован нитрил **26**, обработка которого охлаждённым раствором пирролидина в сухом ТГФ приводит к amidину **27**. При взаимодействии альдонитрона **27** с пент-4-енилмагнийбромидом с последующим гидролизом и окислением MnO_2 наблюдается образование нескольких веществ, причём выделить из реакционной смеси в индивидуальном виде удалось только продукт дезоксигенирования целевого алкенилнитрона **29**. Доказательством его образования служит принадлежащий иминному атому углерода узловый сигнал в спектре ЯМР ^{13}C при 170 м.д., тогда как соответствующий сигнал нитронного атома углерода в 4*H*-имидазол-3-оксидах наблюдается обычно в более сильном поле при ~ 150 м.д. Все оставшиеся сигналы в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C показывают наличие в продукте **29** как пент-4-енильного фрагмента, так и имидазольного гетероцикла.

Получить алкенилнитрон **29** через конденсацию гидроксилминокетона **23** с гекс-5-еналем и аммиаком не удалось: из реакционной смеси был выделен исключительно 2,2,3,5,5,6-гексаметил-2,5-дигидропиразин-1,4-диоксид **31** – продукт конденсации исходного гидроксилминокетона **23** с аммиаком без участия альдегида.

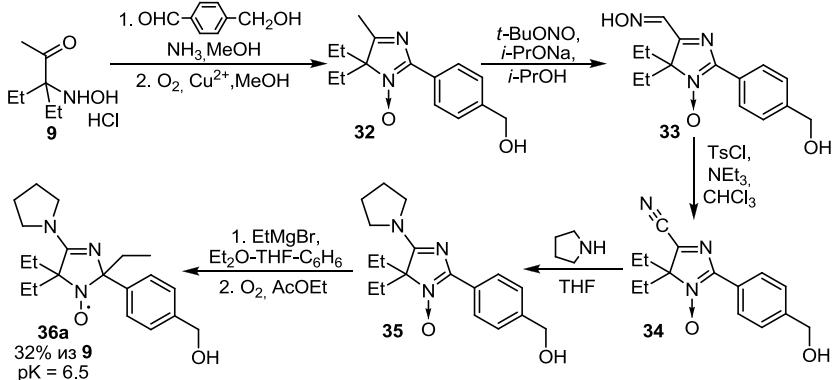
Таким образом, последовательность "введение 4-пентенильного фрагмента – внутримолекулярное 1,3-диполярное циклоприсоединение – раскрытие изоксазолидинового цикла – окисление", успешно используемая в синтезе НР пирролидинового и имидазолинового рядов, не является универсальным методом и её не удастся использовать для синтеза пространственно-затруднённых 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксидов.

СИНТЕЗ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ИМИДАЗОЛИНОВОГО РЯДА С РАЗЛИЧНЫМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ В ПОЛОЖЕНИИ 2 ГЕТЕРОЦИКЛА.

Известный метод синтеза рН-чувствительных спиновых зондов основан на присоединении реактивов Гриньяра к 4*H*-имидазол-3-оксидам. К сожалению, реакция присоединения реактивов Гриньяра к нитронам чувствительна к объёму заместителей, и этот метод, как правило, даёт низкие выходы пространственно-затруднённых НР. Кроме того, подавляющее большинство полученных по этому способу НР содержит неполярные заместители в окружении нитроксильной группы и, вследствие этого, они малорастворимы в воде. Следует отметить, что такие соединения липофильны, следовательно, способны проникать через биологические мембраны, и поэтому быстро восстанавливаются в тканях клеточными ферментативными системами, несмотря на затруднённость нитроксильной группы. Для получения гидрофильных спиновых зондов необходимо разработать методы введения полярных фрагментов, например, путём химической модификации заместителей в боковой цепи, введением функциональных заместителей с использованием защитных групп или ковалентной пришивки спиновых меток к гидрофильным молекулам.

Анализ литературных данных показывает, что наиболее высокие рК демонстрируют радикалы, имеющие только алкильные заместители в окружении нитроксильной группы. Следует отметить, что наиболее высокие рК имеют 2,5-дигидроимидазол-1-оксиды, содержащие пирролидиновый фрагмент в положении 5. Имеются, также, указания на способность карбоксильной группы в боковой цепи повышать рК. Кроме того, известно, что повышенная устойчивость к восстановлению достигается, если в окружение нитроксильной группы вводятся заместители размером больше, чем метил.

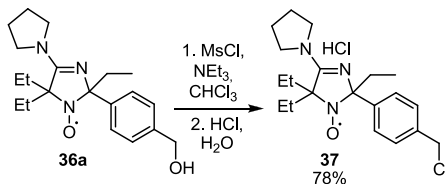
Исходя из этих данных и литературных аналогий, мы предприняли попытку введения функциональных групп в боковую цепь НР модификацией (*п*-гидроксибензил)фенильной группы после построения радикального центра.



Конденсацией гидроксиламинокетона **9** с *n*-гидроксибензальдегидом в насыщенном аммиаке метаноле с последующим окислением кислородом воздуха в присутствии каталитических количеств катионов меди(II) был получен 4*N*-имидазол-3-оксид **32**. Его нитрозировали по метильной группе в положении 5 гетероцикла с помощью *трет*-бутилнитрита в качестве нитрозирующего агента.

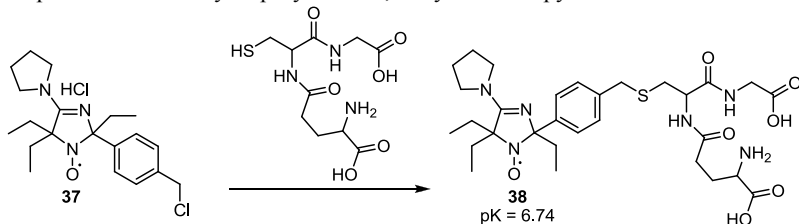
Оксим **33** подвергали бекмановскому расщеплению в сухом хлороформе, из реакционной смеси был выделен нитрил **34**, который выдерживали в вакууме и вводили в реакцию с пиролидином. Проведение реакции в безводном ТГФ позволяет избежать выделения продукта хроматографией: целевой амидин **35** в этих условиях кристаллизуется из реакционной массы.

Соединение **35** вводили в реакцию с избытком этилмагнийбромида в смеси трёх абсолютных растворителей – бензола, эфира и ТГФ, в инертной атмосфере. Исходное соединение **35** и продукты его металлирования по гидроксигруппе ограничено растворяются в этой смеси. Согласно литературным данным, быстрая обработка реакционной массы после добавления избытка EtMgBr даёт невысокий выход целевого продукта, не более 50%. Нами было обнаружено, что для завершения реакции необходимо длительное выдерживание реакционной массы при энергичном перемешивании. Изменение во времени реакции и способе окисления образующегося при разложении реакционной массы водой 1-гидроксипроизводного позволило поднять выход на этой стадии до 90%. Полученный нами радикал **36a** обладает высоким рК (6.5). Этот радикал был использован для синтеза алкилирующей спиновой метки. Нами обнаружено, что реакция соединения **36a** с MsCl идёт без добавления избытка основания, причём она сопровождается замещением мезилоксигруппы хлорид-анионом *in situ*. Протеканию этого процесса способствует уменьшение количества растворителя. Проведённые усовершенствования позволили уменьшить вклад побочных процессов. Это позволило увеличить выход до 78%, а в общем проведённые оптимизации методик позволяют поднять суммарный выход по стадиям в 4 раза по сравнению с описанным в литературе для аналогичного 4-*N,N*-диметиламинопроизводного. Образующиеся хлорпроизводные значительно устойчивее мезилатов, выдерживают хроматографию на силикагеле и могут быть выделены в виде свободных оснований. Гидрохлориды - удобная препаративная форма этих НР, которая выдерживает длительное хранение.

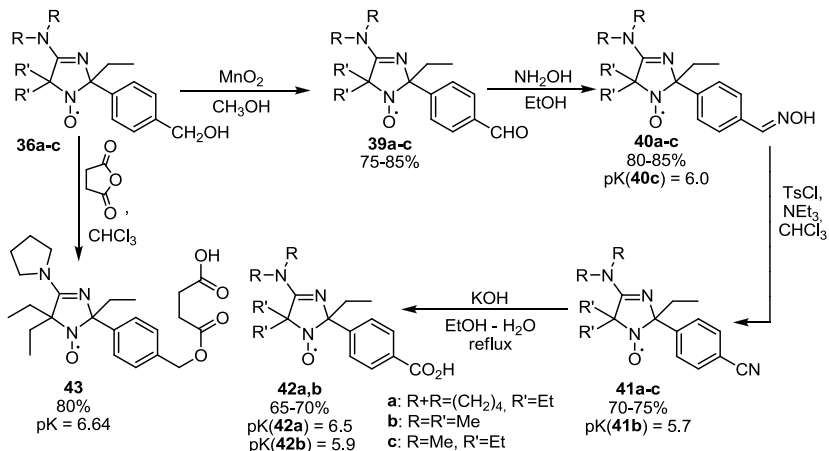


Образец гидрохлорида соединения **37** был передан в Исследовательский Институт Кардиологии и Пульмонологии при Университете штата Огайо (США, г. Коламбус) для синтеза спинового зонда **38**.

Спиновый зонд **38** ($pK = 6.74$) образуется при взаимодействии спиновой метки **37** с гидрофильным пептидом глутатионом, который содержится в крови и цитоплазме и обеспечивает поддержание восстановительного статуса тканей. Этот спиновый зонд использовали для исследования ацидоза в опухолях или в сердечной мышце при ишемии. Он продемонстрировал высокую чувствительность к изменениям pH и достаточно высокое время жизни для проведения измерений. В ходе экспериментов не выявлено признаков токсичности этого соединения. Данные измерений соответствуют результатам, полученным другими методами.

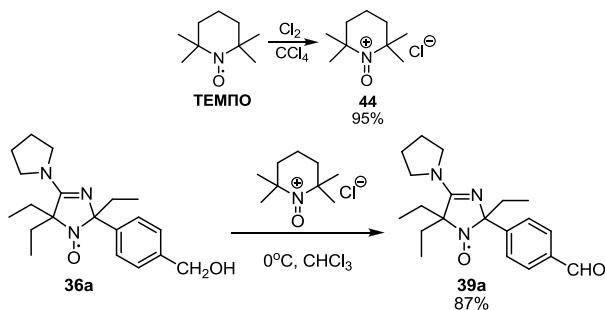


Продолжая исследования зависимости pK от природы функциональных групп в боковой цепи, мы подвергали гидроксигруппу в НР **36a** окислению в карбоксильную. Параллельно данные превращения проводили на изоструктурных радикалах **36b,c**. Нами было обнаружено, что окисление радикалов **36a-c** активным диоксидом марганца в метаноле гладко приводит к образованию соответствующих альдегидов **39a-c** без затрагивания нитроксильной группы и амидинового фрагмента. Следует отметить, что нитроксильные радикалы с альдегидной группой обычно труднодоступные и неустойчивые соединения. Возможная причина этого – способность альдегидов к окислению по радикальному механизму, а также окислительная способность нитроксильной группы и её склонность к захвату C-центрированных радикалов. Для превращения альдегидной группы в карбоксильную мы использовали не прямое окисление, а последовательность реакций, часто применяемых в синтезе спиновых зондов. Альдегиды **39a-c** при взаимодействии с гидроксиламином превращаются в оксимы **40a-c**, бекмановское расщепление которых приводило к образованию нитрилов **41a-c**. Нитрилы **41a-c** кипятили в водном растворе щёлочи с целью получить соли карбоновых кислот **42a-c**. Гидролиз нитрилов протекает через образование амидов, причём предполагается, что амид из нитрила образуется быстро, а гидролизуется долго. Отметим, что циклические амидины не гидролизуются в этих условиях ввиду устойчивости имидазолинового цикла к действию щелочей. Карбоновую кислоту **42c** не удалось выделить из реакционной массы, тогда как соединения **42a,b** были охарактеризованы.

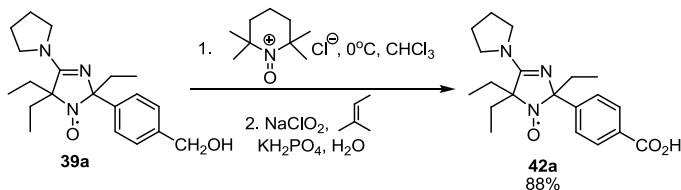


Длительное время гидролиза нитрилов **41a-c** вкупе с невысоким выходом целевых кислот по итогам трёх стадий вынудило нас прибегнуть к поиску одностадийных методов окисления гидроксиметильной группы в карбоксильную и иных способов введения карбоксильной группы в молекулы имидазолиновых НР.

Нитроксильный радикал **36a** вводили в реакцию с оксаммониевой солью **44**, полученной по литературной методике. Это привело к образованию альдегида **39a**, причём выход продукта реакции был выше, чем в случае окисления активированным диоксидом марганца:

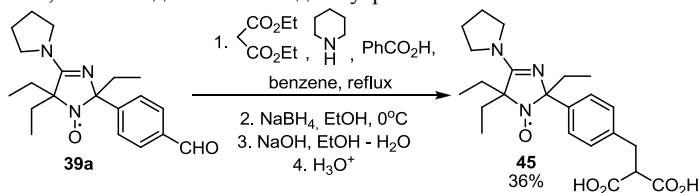


Для получения карбоновой кислоты **42a** альдегид **39a** обрабатывали системой NaClO₂ – изоамилен – KH₂PO₄ – H₂O. Реакцию можно проводить без выделения альдегида, при этом целевая карбоновая кислота **42a** получается с высоким выходом.



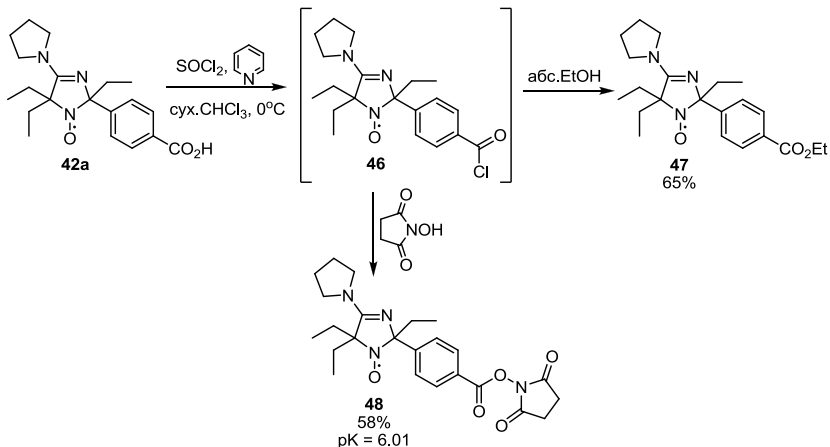
Следует отметить, что этот метод окисления спиртовых групп никогда ранее не применяли для получения производных НР. Он делает спин-меченые карбоновые кислоты много более доступными соединениями, что расширяет возможности дизайна спиновых меток и зондов на основе нитроксильных радикалов самых разнообразных типов.

Ацилирование спирта **36a** янтарным ангидридом приводит к карбоновой кислоте **43**, которая была выделена в виде цвиттер-иона, о чём свидетельствует смещение полосы поглощения карбоксильной группы в ИК-спектре в область низких волновых чисел с появлением второй полосы при $\sim 1450\text{ см}^{-1}$, что типично для карбоксилат-анионов. Конденсация Кнёвенагеля бензальдегида **39a** с малоновым эфиром с последующим восстановлением сопряжённой двойной углерод-углеродной связи и щелочным гидролизом приводит к дикарбоновой кислоте **45**, также выделенной в виде внутренней соли.



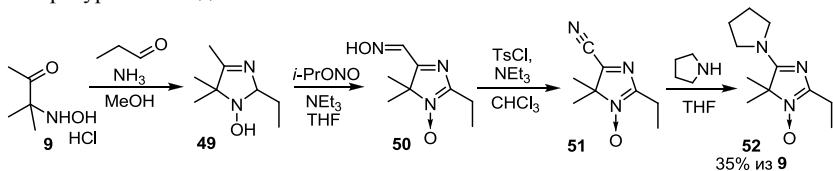
Полученные карбоновые кислоты – гидрофильные водорастворимые соединения. Эти радикалы обладают рН-зависимыми спектрами ЭПР, однако, вопреки ожиданиям, значения рК, полученные при обработке кривых титрования этих карбоновых кислот, мало отличаются от рК соответствующих гидроксиметильных производных.

Обработка кислоты **42a** избытком тионилхлорида в присутствии основания позволяет получить хлорангидрид **46**, взаимодействие которого с абсолютным этанолом или *N*-гидроксисукцинимидом приводит к сложному эфиру **47** или ацилирующей спиновой метке – смешанному ангидриду **48**, соответственно.

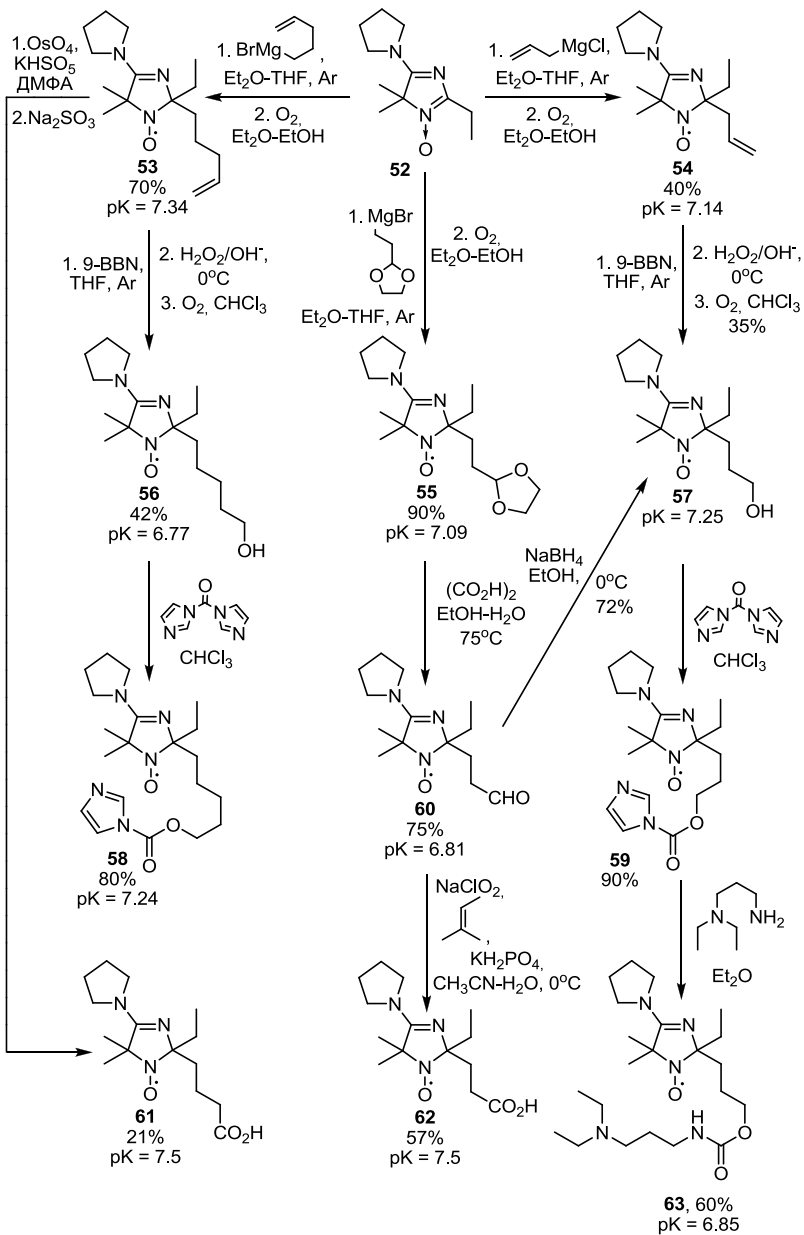


Данные титрования карбоновых кислот **42a,b** показывают, что ароматический спейсер между радикальным центром и функциональными группами в 2,5-дигидроимидазол-1-оксилах не обеспечивает желаемых значений $\text{pK} \geq 7$. Принципиально способ решения этой проблемы очевиден, поскольку известно, что pK 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксилов, содержащих только алифатические заместители в положениях 2 и 5 гетероцикла выше. Наиболее перспективным подходом является введение гидрофильных заместителей на алифатическом спейсере.

В качестве исходного соединения для синтеза рН-чувствительных спиновых меток и зондов с улучшенными характеристиками (более высоким pK) был выбран амидин **52**. Это соединение было синтезировано по аналогии с литературной методикой.



Обработка нитрона **52** реактивами Гриньяра, содержащими функциональные заместители, позволила получить серию стабильных нитроксильных радикалов **53-55**, обладающих $\text{pK} > 7$.



Выход радикала **54** оказался невысоким, по-видимому, из-за неполной конверсии аллилхлорида в процессе получения реактива Гриньяра, а также вероятных побочных процессов, связанных с переметаллированием аллильной группы или алкилированием аниона гидроксильной аллилхлоридом, непрореагировавшим с магнием. Радикалы **53** и **55** были получены с высокими выходами. Для дальнейшей модификации боковой цепи алкенилнитроксида **53** и **54** вводили в реакцию с 9-BBN. После обработки реакционной массы были выделены соответствующие первичные спирты **56** и **57**.

Значения рК синтезированных спиртов выше 7, что делает их перспективными объектами для создания спиновых меток. При взаимодействии радикалов **56** и **57** с карбонилдиимидазолом с высоким выходом были получены спиновые метки **58** и **59**, селективно ацилирующие первичные амины. Ожидается, что на базе соединений **58** и **59** могут быть получены новые, обладающие рК > 7 парамагнитные молекулярные зонды для исследования живых систем. Так, при взаимодействии спиновой метки **59** с *N,N*-диэтилпропилендиамином был получен спин-меченый уретан **63**, значение рК которого также было измерено нашими коллегами. Таким образом, нами показана возможность селективного ацилирования первичных аминогрупп карбонилдиимидазольными спиновыми метками **58** и/или **59**.

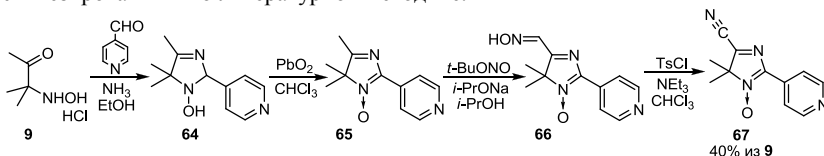
Окислительным расщеплением терминальной кратной углерод-углеродной связи в алкенилнитроксиде **53** была синтезирована карбоновая кислота **61**, обладающая высоким значением рК = 7.5, что объясняется, по-видимому, стабилизацией протонированной формы путём координации амидинового фрагмента и карбоксильной группы. Взаимодействием нитрона **52** с 2-(1,3-диоксолан-2-ил)этилмагнийбромидом с последующим окислением был получен нитроксильный радикал **55** с высоким выходом. Гидролиз диоксоланового цикла и последующее окисление образующегося альдегида **60** приводит к гомологичной соединению **61** карбоновой кислоте **62**, рК которой также составляет 7.5. Следует отметить возможность получения карбинола **57** восстановлением альдегида **60**. Такой путь позволяет избежать протекающего с невысоким выходом гидроборирования-окисления.

Таким образом, нами показано, что 4-пирролидин-1-ил-2,5-дигидроимидазол-1-оксилы, содержащие ароматический спейсер между радикальным центром и функциональными заместителями в положении 2 гетероцикла обладают рК < 7, при переходе к алифатическому спейсеру значения рК возрастают до 7 и выше. Ранее содержащие функциональные заместители 2,5-дигидроимидазол-1-оксилы с рК > 7 описаны не были.

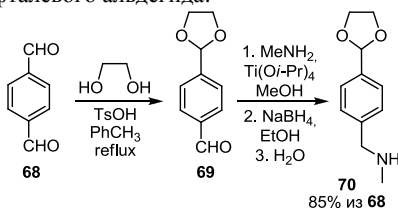
СИНТЕЗ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ИМИДАЗОЛИНОВОГО РЯДА С РАЗЛИЧНЫМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ ПРИ ЭКЗОЦИКЛИЧЕСКОМ АТОМЕ АЗОТА АМИДИНОВОЙ ГРУППИРОВКИ.

pH-чувствительные спиновые зонды успешно используются для изучения поверхностей многих неорганических и органо-неорганических мезопористых материалов (катализаторов, сорбентов и др.). Все исследования в этом направлении проводятся путём адсорбции нитроксильного радикала на поверхности материала. Актуальной задачей в этой области является ковалентное связывание НР с поверхностями исследуемого материала. Это позволило бы снять вопросы о локализации зонда в исследуемых образцах и получать более достоверную информацию. Наиболее перспективным направлением представлялась разработка спиновых меток на базе известного спинового зонда – 5-диметиламино-4,4-диметил-2-(4-пиридил)-2,5-дигидроимидазол-1-оксида, отличающегося монотонным изменением параметров спектра ЭПР при изменении кислотности в очень широком диапазоне pH 2 ÷ 6. Во избежание сильного изменения свойств, активную функциональную группу вводили к экзоциклическому атому азота амидиновой группировки.

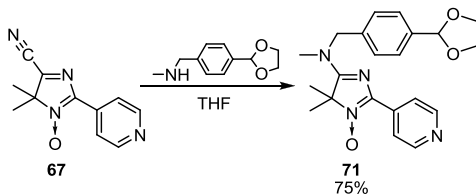
В качестве стартового соединения был использован нитрил **67**, синтезированный по литературной методике.



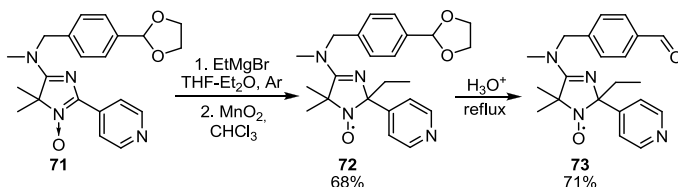
5-Циано-4*N*-имидазол-3-оксиды гладко реагируют с аминами с образованием амидинов, для превращения которых в нитроксильный радикал необходима обработка реактивом Гриньяра, поэтому вводимая в положение 4 гетероцикла функциональная группа должна быть защищена. Поэтому для последующей модификации выбран 4-(1,3-диоксолан-2-ил)бензилметиламин **70**, полученный из терефталевого альдегида:



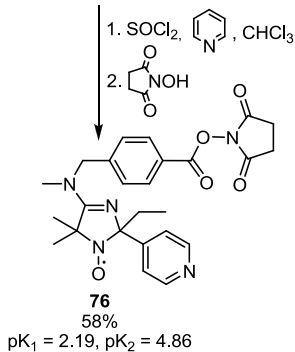
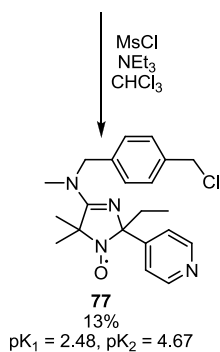
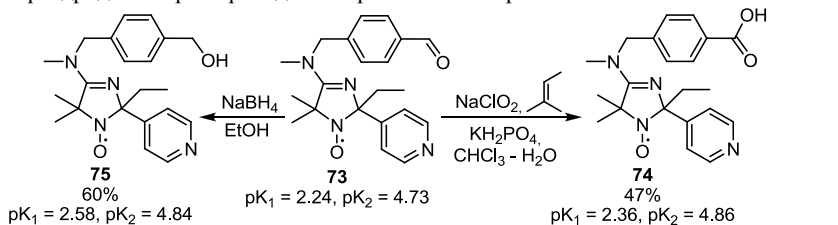
Обработка нитрила **67** 4-(1,3-диоксолан-2-ил)бензилметиламином **70** привела к образованию амидина **71**.



При взаимодействии амида **71** с избытком этилмагнийбромида с последующим окислением диоксидом марганца был получен нитроксильный радикал **72**.



Кипячение радикала **72** в разбавленном водном растворе HCl приводило к снятию ацетальной защиты. Полученный альдегид **73** подвергали окислению системой NaClO₂ – изоамилен – KH₂PO₄ – H₂O. Выход соответствующей карбоновой кислоты **74** составил 47%. Восстановление альдегида **73** боргидридом натрия приводит к образованию спирта **75**.



В отличие от описанных нами ранее превращений бензильной гидроксигруппы в хлорпроизводные при взаимодействии спирта **75** с метансульфохлоридом в присутствии триэтиламина выход целевого хлорида **77** не превышает 13%. Возможно, в ходе данного превращения также образуются олигомерные продукты межмолекулярного алкилирования пиридинового атома азота вновь образующимся хлорметилфенильным фрагментом другой молекулы, выделить которые из реакционной смеси не удалось. Кислоту **74** превращали в смешанный ангидрид **76** взаимодействием образующегося *in situ* хлорангидрида с *N*-гидроксисукцинимидом. В ходе вышеуказанных процедур были получены две спиновые метки – ацилирующая **76** и алкилирующая **77**. Все соединения этого ряда имеют два значения рК – относящихся к протонированию по амидиновой группе и по атому азота пиридинового цикла. В соответствии с общими представлениями об основности, значение рК амидинового фрагмента должно быть выше, чем у пиридинового. Однако, согласно симуляции, более кислый рК сопровождается изменением константы СТВ порядка 1 Гс, что скорее соответствует протонированию по амидину, а при рН ~ 5 изменение константы СТВ меньше, что более характерно для протонирования пиридинового фрагмента. Значения рК для соединения **76** составляют 2.19 и 4.86, соответственно. Синтезированные метки, как и ожидалось, чувствительны к изменению кислотности в широком диапазоне (~5 ед. рН). Плавное монотонное изменение константы СТВ в интервале рН с 1 до 6 делает их перспективными для исследования свойств поверхностей сорбентов и катализаторов. Наличие функциональных групп, способных эффективно ковалентно связываться с некоторыми поверхностями может обеспечить жёсткую фиксацию на определённом расстоянии, что позволит исследовать свойства приповерхностного слоя.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что лёгкость циклизации 2-(пент-4-енил)-4*H*-имидазол-3-оксидов по типу внутримолекулярного 1,3-диполярного циклоприсоединения зависит от размера заместителей в положении 4: 4,4-диметильные производные легко образуют соответствующие циклоаддукты, для 4,4-диэтильных производных не удаётся достичь удовлетворительной глубины превращения.

2. Исследована возможность синтеза нитроксильных радикалов ряда 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксила, содержащих гидрофильные фрагменты в боковой цепи через взаимодействие 5,5-диалкиламино-4*H*-имидазол-3-оксидов с реактивами Гриньяра. Показано, что этот метод позволяет получать нитроксильные радикалы с гидроксигруппами, 1,3-диоксолановым фрагментом или терминальным этиленовым фрагментом в боковой цепи, которые затем могут быть превращены в различные функциональные производные с сохранением нитроксильной группы. В результате синтезирован набор новых водорастворимых спиновых зондов, обладающих рН-зависимым спектром ЭПР, в том числе, чувствительных к изменениям кислотности в физиологически важном диапазоне (рН 6 ÷ 8).

3. Модификацией 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксилов, содержащих гидроксильные или карбоксильные группы, впервые получены ацилирующие рН-чувствительные спиновые метки, пригодные для ковалентного связывания, например, с аминогруппами.

4. Впервые получены алкилирующие рН-чувствительные спиновые метки с рК около 7. Показано, что присоединение активной алкилирующей группы к 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксидам через жёсткий *para*-фениленовый фрагмент позволяет избежать внутримолекулярного алкилирования и обеспечивает устойчивость спиновых меток при хранении и удобство их применения.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Edeleva, M.V., Parkhomenko, D.A., Morozov, D.A., Dobrynin, S.A., **Trofimov, D.G.**, Kanagatov, B., Kirilyuk, I.A., Bagryanskaya, E.G. Controlled/living polymerization of methyl methacrylate using new sterically hindered imidazoline nitroxides prepared via intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition reaction. // Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. – 2014. – V.52. – №76. – P. 929 – 943.
2. Bobko, A.A., Eubank, T.D., Voorhees, J.L., Efimova, O.V., Kirilyuk, I.A., Petryakov, S., **Trofimov, D.G.**, Marsh, C.B., Zweier, J.L., Grigor'ev, I.A., Samouilov, A., Khrantsov, V.V. In Vivo Monitoring of pH, Redox Status, and Glutathione Using L-Band EPR for Assessment of Therapeutic Effectiveness in Solid Tumors. // Magnetic Resonance in Medicine. – 2012. – V.67. – №6. – P. 1827 – 1836.
3. Komarov, D.A., Dhimitruka, I., Kirilyuk, I.A., **Trofimov, D.G.**, Grigor'ev, I.A., Zweier, J.L., Khrantsov, V.V. Electron Paramagnetic Resonance Monitoring of Ischemia-Induced Myocardial Oxygen Depletion and Acidosis in Isolated Rat Hearts Using Soluble Paramagnetic Probes. // Magnetic Resonance in Medicine. – 2012. – V.68. – №8. – P. 649 – 655.

4. Samouilov, A., Efimova, O.V., Bobko, A.A., Sun, Z., Petryakov, S., Eubank, T.D., **Trofimov, D.G.**, Kirilyuk, I.A., Grigor'ev, I.A., Takahashi, W., Zweier, J.L., Khrantsov, V.V. In Vivo Proton–Electron Double-Resonance Imaging of Extracellular Tumor pH Using an Advanced Nitroxide Probe. // Analytical Chemistry. – 2014. – V.86. – Part 2. – P. 1045 – 1052.

Результаты диссертации доложены на международных и отечественных конференциях:

1. **Трофимов Д.Г.** Синтез 2-(пент-4-енил)-5-пирролидино-4,4-диэтил-4*H*-имидазол-3-оксида. // Научный семинар «Химия гетероциклических соединений», посвящённый 85-летию со дня рождения чл.-корр. АН СССР В.П. Мамаева: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 30 ноября – 2 декабря 2010 г. – С. 35.
2. **Трофимов Д.Г.** Синтез гидрофильных спиновых зондов на основе нитроксильных радикалов ряда имидазолина. // Материалы XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 30 ноября – 1 декабря 2011 г. – С. 73.
3. Kirilyuk, I.A., Zhurko, I.F., **Trofimov, D.G.**, Grigor'ev, I.A. Molecular Design of pH-Sensitive Spin Probes for Biomedical Research. // Current Topics in Organic Chemistry: Book of Abstracts. – Novosibirsk, Russia. – June 6–10, 2011. – P. 28.
4. **Трофимов Д.Г.** Синтез функциональных производных 2-(4-гидрокси-метилфенил)-2,5-дигидроимидазол-1-оксидов. // Конкурс молодых учёных НИОХ СО РАН: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 16 – 21 апреля 2011. – С. 24.
5. **Трофимов Д.Г.** Синтез спироциклических нитроксильных радикалов из 2-(пент-4-енил)-4*H*-имидазол-3-оксидов. // Материалы 50-й юбилейной международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 13–19 апреля 2012. – С. 70.
6. **Трофимов Д.Г.**, Морозов, Д.А., Кирилюк, И.А. Реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения в синтезе нитроксильных радикалов из 2-(пент-4-енил)-4*H*-имидазол-3-оксидов. // Молодёжная научная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии»: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 9–14 июля 2012. – С. 41.
7. Еделева, М.В., Морозов, Д.А., Канагатов, Б., Пархоменко, Д.А., Добрынин, С.А., **Трофимов, Д.Г.**, Кирилюк, И.А., Багрянская, Е.Г. Стерически затруднённые нитроксиды как эффективные медиаторы радикальной контролируемой полимеризации метакриловых мономеров. // Молодёжная научная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии»: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 9–14 июля 2012. – С. 63.
8. **Trofimov, D.G.**, Kirilyuk, I.A. New functional derivatives of 2-(4-hydroxymethylphenyl)-2,5-dihydroimidazol-1-oxyls. // 10th International Congress of Young Chemists «YoungChem 2012»: Book of Abstracts. – Gdansk, Poland. – October 10–14, 2012. P. 152.

9. Morozov, D.A., Dobrynin, S.A., **Trofimov, D.G.**, Kirilyuk, I.A. Synthesis of a Spyro-cyclic Nitroxide Radicals via 1,3-dipolar Cycloaddition Reaction. // VI International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles»: Book of Abstracts. – Kharkov, Ukraine. – November 12–16, 2012. – O–11.
10. Edeleva, M.V., Morozov, D.A., Kanagatov, B., Parkhomenko, D.A., Dobrynin, S.A., **Trofimov, D.G.**, Kirilyuk, I.A., Bagryanskaya, E.G. New Sterically Hindered Nitroxides as Efficient Mediators in Nitroxide Mediated Polymerization (NMP) of metacrylic monomers. // VI International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles»: Book of Abstracts. – Kharkov, Ukraine. – November 12–16, 2012. – P–61
11. **Трофимов, Д.Г.** Функционализация пространственно-затруднённых нитроксильных радикалов ряда 2,5-дигидроимидазол-1-оксила. // Молодёжная конференция НИОХ СО РАН, посвящённая 55-летию института: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 3–5 декабря 2013. – С. 31.
12. **Трофимов, Д.Г.**, Кирилюк, И.А., Григорьев, И.А. Функционализация пространственно затруднённых нитроксильных радикалов ряда 2,5-дигидроимидазол-1-оксила. // Уральский научный форум «Современные проблемы органической химии»: Сборник тезисов. – Екатеринбург. – 8–12 июня 2014. – С. 75.
13. Kirilyuk, I.A., **Trofimov, D.G.**, Zhurko, I.F., Grigor'ev, I.A. Nitroxide pH-sensitive spin labels and spin probes : recent, advances and prospects. // VII International Conference on Nitroxide Radicals (SPIN – 2014): Book of Abstracts. – Zelenogradsk, Kaliningrad region, Russia. – September 14–20, 2014. – P. 45.
14. Morozov, D.A., Dobrynin, S.A., **Trofimov, D.G.**, Kirilyuk, I.A. Intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition reaction in the sterically shielded nitroxides synthesis. // VII International Conference on Nitroxide Radicals (SPIN – 2014): Book of Abstracts. – Zelenogradsk, Kaliningrad region, Russia. – September 14–20, 2014. – P. 47.
15. **Trofimov, D.G.**, Kirilyuk, I.A., Grigor'ev, I.A. Derivatives of 4-amino-2,5-dihydroimidazole-1-oxyl with functional groups at positions 2 and 4. // VII International Conference on Nitroxide Radicals (SPIN – 2014): Book of Abstracts. – Zelenogradsk, Kaliningrad region, Russia. – September 14–20, 2014. – P. 98.
16. **Трофимов Д.Г.** Синтез 2,5-дигидроимидазол-1-оксилов, содержащих функциональные заместители в положениях 2 и 4 гетероцикла. // Молодёжная конференция НИОХ СО РАН, посвящённая 90-летию со дня рождения чл.-корр. АН СССР В.П. Мамаева: Сборник тезисов. – Новосибирск. – 1–3 декабря 2015. – С. 38.

Формат бумаги 60x84 1/16. Объём печати 1 печ. лист.

Заказ № . Тираж 100 экз.

Отпечатано на ротапринте ФГБУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

630090, г. Новосибирск – 90, пр. ак. Лаврентьева, 9

