

# Zur Reaktion von 2,2-Diphenyl-1,2-dihydrochinolin-Nitroxid-Radikalen mit dem NO-Donator SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin)<sup>†)</sup>

Horst Weber<sup>a)\*</sup>, Andreas Grzesiak<sup>a)</sup>, Hans-Gert Korth<sup>b)</sup> und Reiner Sustmann<sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40255 Düsseldorf

<sup>b)</sup> Institut für Organische Chemie, Universität-GH Essen, Universitätsstr. 5, D-45117 Essen

Eingegangen am 16. März 1994

Die Nitroxid-Radikale **1** eignen sich zum *in situ*-Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>), das unter aeroben Bedingungen aus dem Molsidomin-Metaboliten SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) freigesetzt wird. Außer den stabilen Produkten **2**, **3** und **4** entstehen bei dieser Reaktion auch die instabilen Aminoxyle **5**, die sich zu den stabilen Folgeprodukten **3**, **6** und **7** zersetzen. **7a** entsteht auch bei der Reaktion von **1a** mit *Fentons*-Reagenz. **7b** läßt sich unabhängig durch Hexacyanoferrat(III)-Oxidation aus dem Nitroxid **8** herstellen. Die Bildungsweise der Verbindungen **2-5** wird vor dem Hintergrund der relativen Reaktivität von **1** gegenüber Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) bzw. Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) diskutiert.

## Reaction of 2,2-Diphenylquinoline-nitroxide Radicals with NO-Releasing SIN-1 (3-Morpholinosydnonimine)

The nitroxide radicals **1** are suitable traps for nitric oxide (NO<sup>•</sup>) released from SIN-1 under aerobic conditions. Besides the stable products **2**, **3**, and **4**, the relatively unstable nitroxides **5** are formed in this reaction, the latter decomposing to the stable derivatives **3**, **6**, and **7**. **7a** is also formed by reaction of **1a** with *Fenton's* reagent. **7b** is synthesized unequivocally by alkaline ferricyanide-oxidation of the nitroxide **8**. Formation of compounds **2-5** is discussed in relation to relative reactivity of **1** towards nitric oxide (NO<sup>•</sup>) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), respectively.

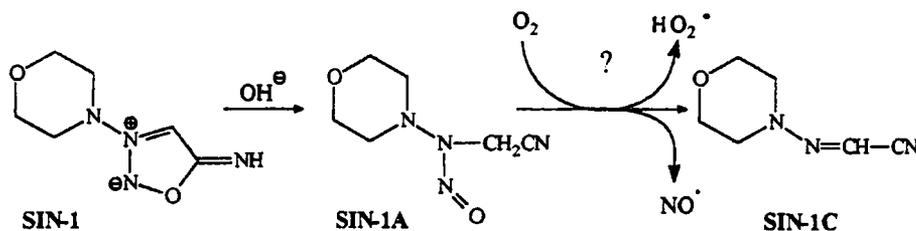
Die als Spinfallen für NO<sup>•</sup> geeigneten Radikale **1** ergeben mit überschüssigem NO<sup>•</sup> in Diethylether unter Ausschluß von Sauerstoff ein komplexes Produktspektrum<sup>1)</sup> mit den Hauptkomponenten **2** und **3**<sup>2)</sup>. Zur Simulation ähnlicher Verhältnisse, wie sie bei der physiologischen Bildung von NO<sup>•</sup> aus L-Arginin herrschen<sup>3,4)</sup>, schien der Molsidomin-Metabolit SIN-1 geeignet. Dieser setzt in wäßrigem Milieu über SIN-1A nach dessen Autoxidation NO<sup>•</sup> frei und geht dabei in das Hydrazon SIN-1C über<sup>5,7)</sup>.

Wir führten diese Reaktion unter aeroben Bedingungen in Dioxan-haltigem Phosphat-Puffer pH 7.5 in Anwesenheit der Aminoxyle **1** durch und konnten zusätzlich zu den erwarteten Produkten **2**, **3** und **4**<sup>1)</sup> die neuartigen Radikale **5** nachweisen.

Während **5b** nur als Rohprodukt zu erhalten war, konnte **5a** nahezu analysenrein isoliert werden. Das durch Computer-Simulation mit den im Exp. Teil angegebenen Aufspaltungsparametern vollständig reproduzierbare ESR-Spektrum von **5a** (Abb. 1) weist zwei nicht-äquivalente <sup>14</sup>N-Kopplungen auf, die dem Stickstoffkern N-1 der

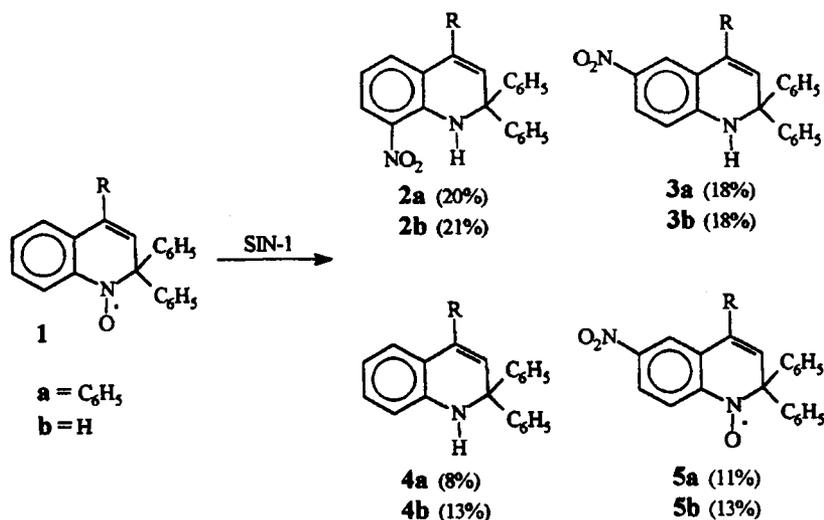
Nitroxyl-Gruppe bzw. dem der Nitrogruppe an C-6 zugeordnet werden können. In Übereinstimmung mit der für einen *para*-Nitro-Substituenten am aromatischen System zu erwartenden erhöhten Delokalisierung des ungepaarten Elektrons ist die <sup>14</sup>N-Aufspaltung des Nitroxyl-Stickstoffatoms ( $a(N) = 0.875$  mT) deutlich gegenüber der Aufspaltung anderer 1,2-Dihydrochinolinyl-1-oxyl-Radikale ( $a(N) \geq 1$  mT) erniedrigt.

Das EI-Massenspektrum von **5a** zeigt lediglich M<sup>+</sup> und das Fragmentierungsmuster der Zersetzungsprodukte **3a**, **6a** und **7a**. Erst durch DCI-Ionisation (NH<sub>3</sub>) ließ sich bei Registrierung der negativen Ionen auch das [M<sup>-</sup>]-Ion von **5a** nachweisen. Lösungen von **5** in Chloroform zersetzen sich langsam schon bei 20°C, schneller beim Erhitzen oder Belichten. Als stabile Folgeprodukte entstehen dabei **3**<sup>1)</sup>, **6**<sup>1)</sup> und **7**, die durch Flash-Chromatographie an Kieselgel getrennt werden konnten. **7a** ist das einzige Reaktionsprodukt bei der Umsetzung von **1a** mit Wasserstoffper-



Schema 1

<sup>†)</sup> Herrn Professor Dr. H.J. Roth zum 65. Geburtstag gewidmet.



Schema 2

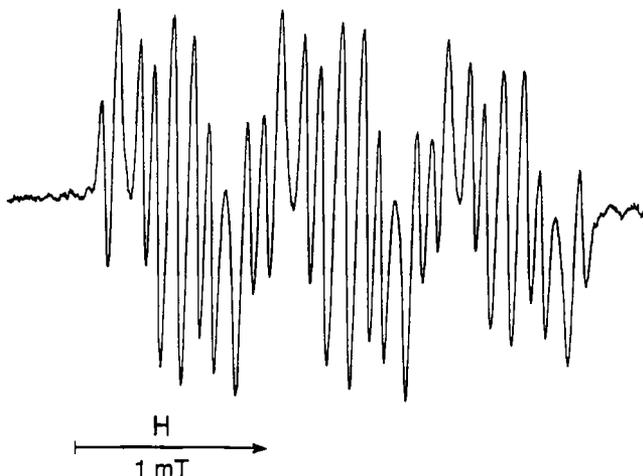


Abb. 1: ESR-Spektrum von 5a

oxid/Eisen(II)-EDTA (*Fentons-Reagenz*)<sup>8</sup>. 7b wurde außerdem auch durch alkalische Hexacyanoferrat(III)-Oxidation von 8<sup>9</sup> dargestellt.

Die Struktur der Nitrone 7 ergibt sich eindeutig aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren und wurde für 7b zusätzlich durch das gated-decoupling <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum gesichert.

### Diskussion

Die Nitroxid-Radikale 1 eignen sich auch in wässrigen Systemen bei Anwesenheit von Sauerstoff zum Nachweis von NO<sup>•</sup>. Allerdings ist die Ausbeute an den charakteristischen Nitroprodukten 2 und 3 unter diesen Bedingungen deutlich geringer als unter Luftausschluß in Diethylether. Dafür ist außer dem höheren Anteil der nicht nitrierten 1,2-Dihydrochinoline 4 vor allem die konkurrierende Bildung der Aminoxyle 5 verantwortlich, die durch direkte Radikalrekombination von 1 und NO<sub>2</sub><sup>•</sup> entstehen, das unter den aeroben Bedingungen in höheren Konzentrationen vor-

liegt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß 5 offensichtlich nur bei relativ geringer NO<sub>2</sub><sup>•</sup>-Konzentration stabil ist, da die Umsetzung von 1 mit überschüssigem NO<sup>•</sup>-freien NO<sub>2</sub><sup>•</sup> zur vollständigen Zersetzung der Aminoxyle führt, ohne daß definierte Produkte nachzuweisen sind.

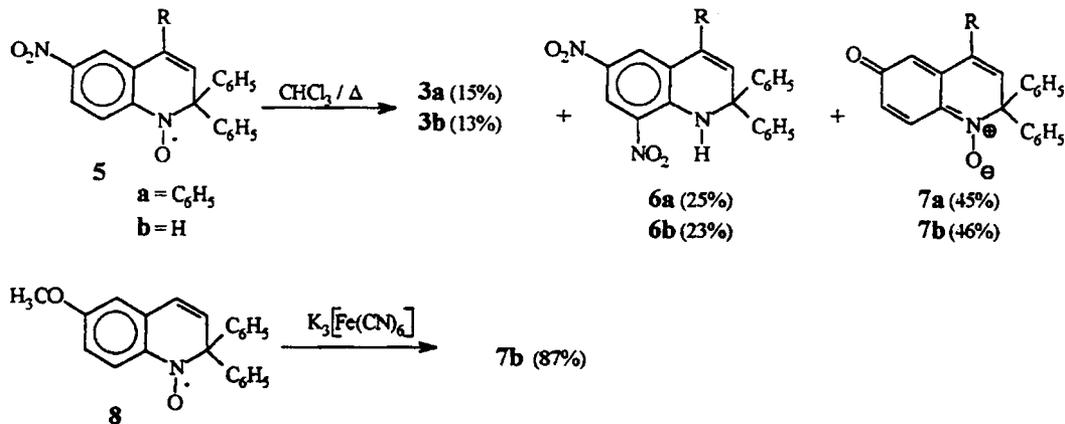
Das Auffinden von 5 trägt zum Verständnis der bisher noch ungeklärten Bildungsweise der nitrierten Nitrosamine 11 sowie der Dinitroderivate 6 aus 1 mit überschüssigem NO<sup>•</sup> bei<sup>1</sup>.

Als Spinfalle für NO reagiert 5 zum Intermediat 9 weiter, das unter Abspaltung von NO<sub>2</sub><sup>•</sup> in bekannter Weise<sup>1</sup> zum Aminylradikal 10 zerfällt, aus dem sich je nach den Reaktionsbedingungen die Folgeprodukte 3, 6 und 11 zwanglos erklären lassen.

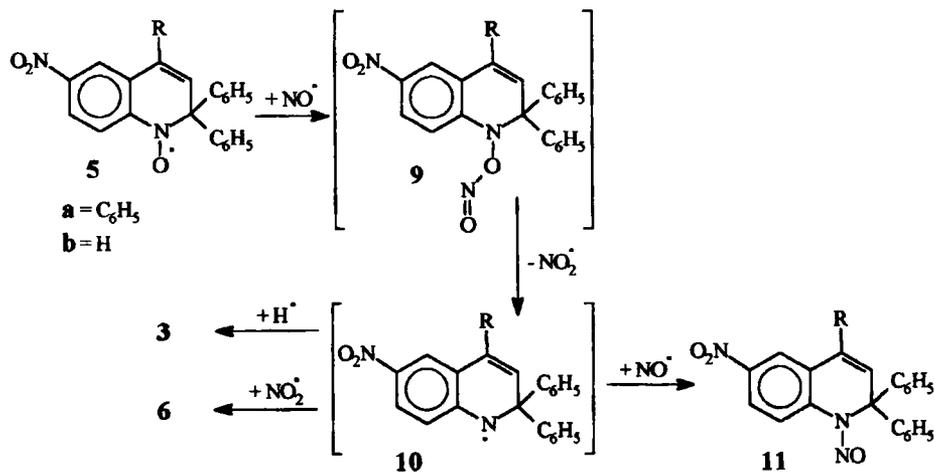
Sinkt die Konzentration an NO<sup>•</sup> während der Reaktion immer weiter ab, wie bei der Autoxidation von SIN-1 in Anwesenheit von 1, bleibt 5 im Ansatz stabil und kann wie im vorliegenden Fall sogar isoliert werden.

Die Zersetzung der Nitroxid-Radikale 5 zu den Nitronen 7 erinnert zwar formal an die *Nef-Reaktion*<sup>10</sup>, läuft aber unter völlig andersartigen Bedingungen ab und liefert nicht N<sub>2</sub>O, sondern durch Abspaltung von NO<sup>•</sup> die Produkte 3 und 6. Insofern gleicht sie eher einer für Nitroaromaten charakteristischen Fragmentierung bei der Massenspektrometrie<sup>11</sup>, die in ähnlicher Weise auch bei der Photoreaktion entsprechender Verbindungen beobachtet wird<sup>12</sup>. In beiden Fällen kommt es dort über spirocyclische Zwischenstufen zur Ausbildung radikalischer Salpetrigsäureester von Phenolen, die anschließend NO<sup>•</sup> abspalten. Eine ähnliche Umwandlung über 12 und 13 dürfte 5 auf dem Weg zu 7 erleiden, wobei das freigesetzte NO<sup>•</sup> mit intaktem 5 in bekannter Weise über 9 zu 3 und 6 weiterreagiert<sup>1</sup>.

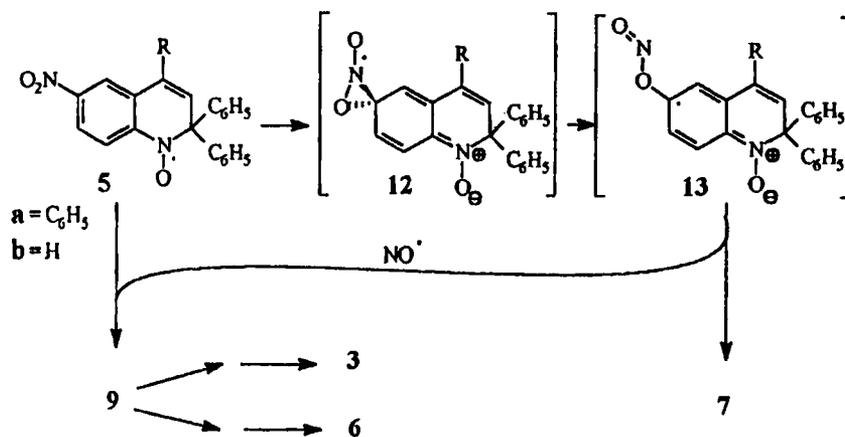
Auch nach sorgfältiger Analyse konnten die Nitrone 7 nicht als primäre Reaktionsprodukte aus den Ansätzen von 1 mit SIN-1 nachgewiesen werden. Sie entstehen erst als Zersetzungsprodukte von 5. Dieser Befund war überraschend, da bei der oxidativen NO<sup>•</sup>-Freisetzung aus SIN-1 auch Superoxid entstehen soll<sup>5-7</sup>, das mit 1 ähnlich wie



Schema 3



Schema 4



Schema 5

Peroxidradikale ( $\text{ROO}^\cdot$ ) direkt zu den entspr. Nitronen reagieren könnte<sup>13</sup>). Deshalb wurde **1a** mit Dithranol und Sauerstoff in Dioxan/Puffer bei pH 7.8 umgesetzt, einem System, das zur Bildung von Superoxid geeignet ist<sup>14</sup>). Hierbei zeigte sich innerhalb von 4 h jedoch keine Verände-

rung von **1a**. Andererseits kann durch die Bildung von **7a** durch *Fenton*-Reaktion von **1a** ausgeschlossen werden, daß bei der aeroben Zersetzung von SIN-1 OH-Radikale eine Rolle spielen.

## Experimenteller Teil

<sup>1</sup>H-NMR: Varian FT-80A (80 MHz), Bruker AC200 (200 MHz), Bruker ACP 300 (300 MHz), Bruker ACP 300 (75 MHz), (interner Standard TMS).- IR: Perkin Elmer 1600 Series FTIR.- MS: Finnigan 3500 (EI), INCOS 50 Finnigan MAT (DCI).- ESR: Bruker ER-420.- Elementaranalyse: Zentrale Einrichtung Chemie/Pharmazie "Mikroanalyse" der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Umsetzung der 1,2-Dihydrochinolinyl-1-oxyle **1** mit 3-Morpholinosydnonimin Hydrochlorid (SIN-1) in Dioxan/Phosphat-Puffer bei pH 7.5

**1a**<sup>1)</sup> (0.5 g, 1.3 mmol) bzw. **1b**<sup>1)</sup> (1.7 mmol), in Dioxan (100 ml) gelöst, werden mit einer äquimolaren Menge SIN-1 (für **1a**: 0.27 g; für **1b**: 0.35 g) in Phosphat-Puffer pH 7.5 (50 ml, 0.07 mol/l) 4 h unter Zutritt von Luft bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 200 ml Wasser wird mit Diethylether extrahiert, die org. Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und bei Raumtemp. i.Vak. zur Trockne eingedampft. Sofortige Flash-Chromatographie an Kieselgel 60 (Säule: 60 cm; ø 3 cm) mit Dichlormethan/Petrolether 40-60°C (1 + 1, V/V) unter Ausschluß von Licht liefert in dieser Reihenfolge:

- aus **1a**: 0.030 g **4a** (8%); 0.100 g Rest von **1a** (20%); 0.110 g **2a** (20%); 0.060 g **5a** (11%); 0.090 g **3a** (18%)
- aus **1b**: 0.062 g **4b** (13%); 0.105 g Rest von **1b** (21%); 0.110 g **2b** (21%); 0.099 g **3b** (18%); 0.075 g **5b** (13%).

### Zersetzung von **5** in Chloroform

Die jeweils angegebene Menge Substanz wird in 20 ml Chloroform gelöst und in einem belüfteten Gefäß 24 h gerührt. Nach Eindampfen i.Vak. wird der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel 60 (Säule: 40 cm; ø 3 cm) mit Dichlormethan/Petrolether 40-60°C (1 + 1, V/V) getrennt. Zur Elution der Nitrone **7** wird nach Elution der Nitroprodukte auf das Fließmittel Dichlormethan/Ethanol (9 + 1, V/V) umgeschaltet. Man erhält in dieser Reihenfolge:

- aus 42 mg **5a** (0.1 mmol): 11 mg **6a** (25%); 6 mg **3a** (15%); 17 mg **7a** (45%);
- aus ca. 40 mg **5b** (0.12 mmol): 10 mg **6b** (23%); 5 mg **3b** (13%); 17 mg **7b** (46%).

### Fenton-Reaktion von **1a**

37.5 mg (0.1 mmol) **1a**<sup>1)</sup> werden in 20 ml Acetonitril gelöst und mit 1 ml 3proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Dazu tropft man unter Rühren eine Lösung von 280 mg Eisen(II)-sulfat und 370 mg Natrium-EDTA in 20 ml Phosphatpuffer pH 7.5. Nach 30 min verdünnt man mit 100 ml Wasser und extrahiert mit Ethylacetat. Nach üblicher Aufarbeitung und SC an Kieselgel (Säule: 20 cm, ø 1 cm) mit Dichlormethan/Petrolether/Ethylacetat (50 + 50 + 1, V/V) erhält man 33 mg **7a** (85%).

### Oxidation des Nitroxid-Radikals **8** mit Kaliumhexacyanoferrat(III)

0.05 g **8**<sup>9)</sup> (0.15 mmol) werden in 10 ml Dioxan gelöst und mit 0.15 g Kaliumhexacyanoferrat(III) (0.45 mmol) in 10 ml Wasser versetzt. Nach Zugabe von 10 Tropfen 10proz. NaOH erfolgt Farbumschlag von Rot nach Gelb. Die Lösung wird mit 20 ml Wasser versetzt und erschöpfend mit Diethylether extrahiert. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i.Vak. zur Trockne gebracht. Ausbeute: 0.041 g **7b** (87%).

### 6-Nitro-2,2,4-triphenyl-1,2-dihydrochinolinyl-1-oxyl (**5a**)

Orangefarbenes Pulver nach Eindampfen der SC-Fractionen i.Vak., Schmp. 119°C (Zers.).- IR (KBr): 3055; 3025; 1598; 1573; 1490; 1311;

1128; 698 cm<sup>-1</sup>.- ESR (9.4 GHz, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15°C): g = 2.00537; g(N-1) = 0.875 (1N), g(NNO<sub>2</sub>) = 0.087 (1N), g(H-8) = 0.300 (1H), g(H-3, H-5, H-7) = 0.125, 0.100, 0.092 (je 1H) mT.- MS (DCI, NH<sub>3</sub>, negative Ionen) m/z (%): 449 (21) (**6a**), 419 (26) [M<sup>-</sup>], 404 (92) (**3a**), 403 (100), 389 (54) (**7a**), 373 (26).- C<sub>27</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (419.5) Ber. C 77.3 H 4.57 N 6.7, Gef. C 77.2 H 5.01 N 6.0.

### 2,2,4-Triphenyl-(2H)-chinolin-6-on-1-oxid (**7a**)

Orangefarbenes Pulver, Schmp. 89°C (Methanol/Wasser).- IR (KBr): 3056; 1613; 1469; 1450; 1441; 1265 cm<sup>-1</sup>.- <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) = 8.01 (d, 1H, 8-H, <sup>3</sup>J = 10.3 Hz), 7.48-7.32 (m, 15 H arom., 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.59 (dd, 1H, 7-H, <sup>3</sup>J = 10.3 Hz, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz), 6.55 (s, 1H, 3-H), 6.13 (d, 1H, 5-H, <sup>3</sup>J = 1.8 Hz).- MS (70 eV) m/z (%): 389 (1.5) [M<sup>+</sup>], 372 (1.3), 312 (2), 239 (7.5), 207 (100), 105 (67).- C<sub>27</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (389.5) Ber. C 83.3 H 4.92 N 3.6 Gef. C 83.1 H 5.09 N 3.6.

### 2,2-Diphenyl-(2H)-chinolin-6-on-1-oxid (**7b**)

Orangefarbenes Pulver, Schmp. 198°C (Methanol/Wasser).- IR (KBr): 3060; 1616; 1476; 1452; 1441 cm<sup>-1</sup>.- <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.87 (d, 1H, 8-H, <sup>3</sup>J = 10.2 Hz), 7.33-7.20 (m, 10 H arom., 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.60 (d, 1H, 4-H, <sup>3</sup>J = 10 Hz), 6.55 (dd, 1H, 7-H, <sup>3</sup>J = 10.2 Hz, <sup>4</sup>J = 1.86 Hz), 6.53 (d, 1H, 3-H, <sup>3</sup>J = 10 Hz), 6.16 (d, 1H, 5-H, <sup>4</sup>J = 1.86 Hz).- <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, gated decoupling): δ (ppm) = 186 (d, C-6, <sup>3</sup>J = 12.6 Hz), 139.8 (m, C-8a), 139 (d, C-8, <sup>1</sup>J = 170 Hz), 138.8 ("r", C-1' (2-Phenyl)), 133.7 (quint, C-4a), 133 (dd, C-7, <sup>1</sup>J = 167 Hz, <sup>3</sup>J = 4.5 Hz), 128.8 (dt, C-4' (2-Phenyl), <sup>1</sup>J = 161 Hz, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz), 128.6 (m, arom. C), 128.5 (m, arom. C), 127 (d, C-3, <sup>1</sup>J = 170 Hz), 122 (dt, C-5, <sup>1</sup>J = 169 Hz, <sup>3</sup>J = 3.8 Hz), 120 (ddt, C-4, <sup>1</sup>J = 166 Hz, <sup>2</sup>J = 1.4 Hz, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz), 84 (s, C-2).- MS (70 eV): 313 (5.6) [M<sup>+</sup>], 297 (4.4), 215 (30), 105 (89), 77 (100).- C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> (313.4) Ber. C 80.5 H 4.83 N 4.5 Gef. C 80.4 H 4.70 N 4.4.

## Literatur

- 1 H. Weber, A. Grzesiok, H.G. Korth, R. Sustmann, *Z. Naturforsch. B* **1994**, *49b*, 1041-1050.
- 2 H. Weber, A. Grzesiok, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1993**, *326*, 839-840.
- 3 H.H.H.W. Schmidt, S.M. Lohmann, U. Walter, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1178*, 153-175.
- 4 D.J. Stuehr, N.S. Kwon, C.F. Nathan, O.W. Griffith, P.L. Feldmann, J. Wiseman, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6259-6263.
- 5 M. Feelisch, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1991** *17* (Suppl. 3), S25-S33.
- 6 E. Noack, M. Feelisch, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, *14* (Suppl. 11), S1-S5.
- 7 H. Bohn, K. Schönafinger, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, *14* (Suppl. 11), S6-S12.
- 8 M. Grooteveld, B. Halliwell, *Free Radical Res. Commun.* **1986**, *1*, 243.
- 9 C. Berti, M. Colonna, L. Greci, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2147-2151.
- 10 W.E. Noland, *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 137-155.
- 11 J.H. Beynon, M. Bertrand, R.G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1739-1745.
- 12 O.L. Chapman, D.C. Heckert, J.W. Reasoner, S.P. Thackaberry, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5550-5554.
- 13 O.T. Kasainkina, T.V. Lobanova, D.V. Fentsov, *Isv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.* **1983**, *10*, 2219-2223; *Chem. Abstr.* **1984**, *100*, 85047b.
- 14 K. Müller, W. Wiegrebe, M. Younes, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1987**, *320*, 59-66.

[Ph237]