

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи



Глушкова Мария Александровна

**Разработка альтернативных методов получения,
изучение физико-химических и фармакокинетических свойств
бета-адренергических агонистов и их метаболитов**

1.4.3. Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н., доцент Попков С.В.

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1 Общая характеристика β -агонистов	12
1.2 Методы синтеза β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов.....	17
1.2.1 Синтез кленбутерола, кленпроперола и кленпентерола	17
1.2.2 Синтез бромбутерола.....	20
1.2.3 Синтез тулобутерола.....	22
1.2.4 Синтез 4-гидрокситулобутерола.....	23
1.2.5 Синтез циматерола и цимбутерола	25
1.2.6 Синтез изопротеренола.....	27
1.2.7 Синтез метапротеренола и тербуталина	30
1.2.8 Синтез рактопамина.....	36
1.2.9 Синтез добутамина	39
1.2.10 Синтез ритодрина.....	42
1.2.11 Синтез прокатерола.....	44
1.2.12 Синтез изоксуприна	47
1.2.13 Синтез хигенамина.....	51
1.3 Синтез 2-амино-2-арилэтанолов, проявляющих β_2 -агонистическую активность.....	54
1.4 Фармакокинетика и метаболизм β -агонистов	57
1.4.1 Метаболизм кленбутерола	59
1.4.2 Метаболизм бромбутерола.....	61
1.4.3 Метаболизм вилантерола	63
1.5 Методы анализа β -агонистов и их метаболитов в биологических средах.....	66
ГЛАВА 2 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	70
2.1 Синтез β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов.....	70
2.1.1 Синтез кленпроперола, кленбутерола, кленпентерола	70
2.1.2 Синтез бромбутерола.....	71

2.1.3 Синтез тулобутерола.....	72
2.1.4 Синтез 4-гидрокситулобутерола.....	73
2.1.5 Синтез циматерола и цимбутерола	75
2.1.6 Синтез изопротеренола.....	76
2.1.7 Синтез метапротеренола и тербуталина	77
2.1.8 Синтез рактопамина.....	78
2.1.9 Синтез добутамина	79
2.1.10 Синтез ритодрина.....	80
2.1.11 Синтез прокатерола.....	81
2.1.12 Синтез изоксуприна	82
2.1.13 Синтез хигенамина.....	84
2.2 Синтез агонистов β_2 -адренорецепторов со структурой 2-амино-2-арилэтанолов	86
2.2.1 Синтез 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов, изомерных аналогов кленпроперола и кленпентерола	86
2.2.3 Синтез 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(алкиламино)этанолов, изомерных аналогов мабутерола и мапентерола	89
2.3 Синтез метаболитов	92
2.3.1 Синтез 4-амино-3,5-дигалогенминдальных кислот, метаболитов бромбутерола и кленбутерола.....	92
2.3.2 Синтез 4-амино-3,5-дигалогенгиппуровых кислот, метаболитов бромбутерола и кленбутерола.....	95
2.3.3 Синтез (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты, метаболита вилантерола	99
2.4 Исследование фармакокинетики бромбутерола и 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-алкиламиноэтанолов	102
2.5 Разработка и апробация методики определения β -агонистов и их метаболитов в печени животных.....	119
ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	128
3.1 Экспериментальная химическая часть.....	128
3.1.1 Синтез β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов	129

3.1.1.1 Синтез кленбутерола, кленпроперола, кленпентерола	129
3.1.1.2 Синтез бромбутерола	132
3.1.1.3 Синтез тулобутерола	135
3.1.3.4 Синтез 4-гидрокситулобутерола, метаболита тулобутерола	136
3.1.1.5 Синтез циматерола и цимбутерола	140
3.1.1.6 Синтез изопротеренола	143
3.1.1.7 Синтез метапротеренола и тербуталина.....	145
3.1.1.8 Синтез рактопамина	150
3.1.9 Синтез добутамина	151
3.1.10 Синтез ритодрина	152
3.1.1.11 Синтез прокатерола	156
3.1.1.12 Синтез изоксуприна.....	160
3.1.1.13 Синтез хигенамина	167
3.1.2 Синтез 2-амино-2-арилэтанолов	171
3.1.2.1 Синтез 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов, изомерных аналогов кленпроперола и кленпентерола	171
3.1.2.2 Синтез 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопрпиламино)этанола, изомерного аналога циматерола	173
3.1.2.3 Синтез гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(<i>трет</i> -бутиламино)этанола (трантинтерола) и гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(<i>трет</i> -пентиламино)этанола, изомерных аналогов мабутерола и мапентерола.....	175
3.1.3 Синтез метаболитов	181
3.1.3.1 Синтез (4-амино-3,5-дибромфенил)гидроксиуксусной кислоты (метаболита бромбутерола) и (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (метаболита кленбутерола).....	181
3.1.3.2 Синтез N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (метаболита бромбутерола) и N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (метаболита кленбутерола).....	184

3.1.3.4 Синтез гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты, метаболита вилантерола	188
3.2 Экспериментальная биологическая часть	191
3.3 Экспериментальная аналитическая часть	194
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	199
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	201
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	202

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. *Бета*-адренергические агонисты (*β*-адреномиметики, *β*-агонисты) – давно известные и широко применяемые в медицинских и ветеринарных целях терапевтические средства для лечения бронхиальной астмы и других обструктивных заболеваний бронхов, оказывающие расслабляющее и спазмолитическое действие [1-3]. С другой стороны, такие препараты стимулируют синтез белка, оказывают значительное антикатаболическое и жиросжигающее действие. Несмотря на то, что *β*-агонисты не являются стероидными гормонами, их используют в качестве альтернативных соединений гормональным регуляторам роста, поскольку они улучшают эффективность использования кормов и способствуют увеличению привеса у крупного рогатого скота, свиней, овец, птиц [4].

В качестве кормовых добавок *β*-агонисты применяют в дозах, превышающих терапевтические в десятки раз. Наряду с этим, длительное применение обеспечивает накопление данных соединений в организме сельскохозяйственных животных. Остаточное количество *β*-адреномиметиков в мясной продукции наносит серьезный вред здоровью потребителей. Начиная с 1990 года, в разных странах мира зарегистрировано немало случаев отравления людей мясом и субпродуктами, содержащими остаточное количество *β*-адреностимуляторов [5-7]. В основном, эта проблема обусловлена нелегальным использованием кленбутерола, самого известного представителя класса данных соединений. Китай – одна из стран, в которой, несмотря на запрет Министерством сельского хозяйства использования кленбутерола и его аналогов, действующий с 1997 года, нелегальное применение *β*-агонистов в качестве кормовых добавок не является редкостью. В последние годы власти страны ужесточают меры контроля использования *β*-адреномиметиков в сельском хозяйстве, что послужило основанием для китайских ученых поиска способов синтеза новых соединений данной группы.

Использование *β*-агонистов в качестве кормовых добавок в Российской Федерации, ЕврАзЭС и странах Евросоюза запрещено и строго регламентируется в соответствии с Директивами ЕС 96/22/ЕС, 96/23/ЕС, а также Указанием Россельхознадзора от 21 сентября 2012 года. Однако, более чем в двадцати странах мира (США, Канада, Бразилия,

Аргентина, Чили и др.) данные препараты зарегистрированы и применяются как стимуляторы роста в животноводстве.

С каждым годом появляются новые аналоги известных β -адреномиметиков, обладающие схожей биологической активностью и, зачастую, более высокой токсичностью. По этой причине возникает необходимость обязательного контроля содержания остаточных количеств β -агонистов в сельскохозяйственной продукции (мясе, субпродуктах), поступающей на российский рынок из-за рубежа, и проведения фармакокинетических исследований с целью оценки их влияния на людей и животных. Для решения данных задач требуется разработка быстрых и современных аналитических методов определения β -агонистов в следовых количествах, что, в свою очередь, возможно лишь при наличии стандартных образцов.

Для более полной оценки соединений с точки зрения фармакокинетики необходимо изучение их метаболических превращений в организме людей и животных. Данный аспект играет большую роль как для определения остаточных количеств β -агонистов в сельскохозяйственной продукции, так и для установления факта их запрещенного использования в качестве кормовых добавок, поскольку в ряде случаев метаболиты идентифицируются в биологических средах более длительное время, чем поступающее в организм вещество. Для подтверждения путей биотрансформации также необходимы стандартные образцы как целевых соединений, так и их метаболитов.

Таким образом, разработка способов синтеза и наработка образцов соединений группы β -агонистов и их метаболитов, проведение фармакокинетических исследований, разработка аналитических методов идентификации целевых соединений и их метаболитов в биологических средах являются **важной и актуальной задачей**.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что соединения группы β -агонистов давно известны и применяются в медицинских и сельскохозяйственных целях, в литературных источниках представлено небольшое количество легко реализуемых способов их получения. Метаболизм большинства β -адреномиметиков изучен, но метаболиты были охарактеризованы только методом жидкостной хроматографии, методы их синтеза в литературе не описаны. Также в литературе представлены методики

определения β -агонистов в различных биологических средах, однако нет методик одновременного определения целевых соединений и их метаболитов.

Цель работы. Разработка способов синтеза и наработка ряда β -агонистов и их метаболитов для определения ксенобиотиков при контроле мясной продукции, импортируемой в Россию из зарубежных стран.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие **задачи**:

- синтезированы соединения группы β -агонистов различных подклассов простыми способами с использованием доступных реагентов;
- впервые синтезированы метаболиты β -агонистов;
- для проведения фармакокинетических исследований разработана методика определения β -агонистов и их метаболитов в биологических жидкостях (кровь, моча), проведены фармакокинетические исследования на лабораторных животных;
- разработана селективная и чувствительная аналитическая методика одновременного определения β -агонистов и их метаболитов в следовых количествах в мясной продукции (печени), разработанная методика апробирована на субпродуктах, ввозимых в Россию из ряда стран.

Научная новизна.

1. Разработаны альтернативные способы получения 14 β -агонистов с традиционной структурой 2-амино-1-арилэтанолов и 5 соединений со структурой 2-амино-2-арилэтанолов (2 соединения в литературе не описаны), обладающих схожей β -агонистической активностью, с использованием коммерчески доступных реагентов. Для рактопамина и добутамина был реализован простой метод синтеза *one pot*.

2. Разработаны способы синтеза метаболитов кленбутерола, бромбутерола, вилантерола, которые ранее были охарактеризованы только методом жидкостной хроматографии.

3. Разработан хромато-масс-спектрометрический метод одновременного определения β -агонистов и их метаболитов в образцах мочи.

4. Проведены фармакокинетические исследования для бромбутерола и 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов по динамике изменения их концентрации в

крови лабораторных животных, изучен профиль экскреции с мочой целевых соединений и их метаболитов.

5. Разработана методика одновременного определения β -агонистов и их метаболитов в следовых количествах в печени сельскохозяйственных животных с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения. Данная методика апробирована на образцах печени коров и свиней, ввезенных в Россию из ряда зарубежных стран.

Теоретическая и практическая значимость. В результате работы синтезировано 22 соединения группы β -агонистов различных подклассов и 5 метаболитов с использованием коммерчески доступных реагентов. Полученные образцы могут быть использованы при анализе субпродуктов, поступающих на российский рынок, на наличие и количественное определение в них следовых количеств β -агонистов и их метаболитов. Разработанная для этих целей аналитическая методика может быть использована компетентными органами, отвечающими за безопасность продуктов питания и кормов. Проведенные фармакокинетические исследования могут быть использованы в медицинских целях для разработки форм лекарственных препаратов на основе β -агонистов, оптимизации условий использования препаратов в клинической практике.

Методология и методы исследования. Для получения β -агонистов и их метаболитов использованы известные методы синтеза с применением коммерчески доступных реагентов. Структуры промежуточных соединений подтверждены данными ^1H ЯМР-спектроскопии, данными хромато-масс-спектрометрии, целевых соединений – данными ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, данными хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. При разработке аналитической методики определения β -агонистов и их метаболитов в биологических средах применены современные методы пробоподготовки, анализ образцов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные альтернативные способы синтеза ряда β -агонистов с применением доступных реагентов.

2. Разработанные способы синтеза 5 метаболитов кленбутерола, бромбутерола, вилантерола.

3. Фармакокинетические исследования для бромбутерола и 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов, включающие в себя установление времени детекции целевых соединений и их метаболитов, определение основных фармакокинетических параметров и оценку выведения исследуемых соединений с мочой.

4. Результаты по разработке аналитической методики одновременного определения β -агонистов и их метаболитов в образцах печени и по апробации данной методики на образцах, ввезенных в Россию из-за рубежа.

Степень достоверности результатов. Достоверность и обоснованность результатов исследований, выводов и рекомендаций подтверждаются применением современных физико-химических методов анализа, использованием метрологически поверенной и аттестованной аппаратуры, методик выполнения анализа.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на ряде конференций: XI и XVIII Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, 2015 г., 2022 г.), VII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва, 2017 г.), XX Молодежная школа-конференция по органической химии (Казань, 2017 г.), Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней» (Сочи, 2021 г., 2022 г.), Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Дни науки в ИГХТУ» (Иваново, 2022 г.), Всероссийская научно-техническая конференция «Проблемы науки. Химия, химическая технология и экология» (Тула, 2022 г.).

Личный вклад автора. Непосредственное участие на всех этапах работы: анализ литературы, выбор и синтез соединений, аналитическое сопровождение каждой стадии, проведение фармакокинетических исследований, разработка и апробация методики анализа соединений в биологических жидкостях, подготовка материалов публикаций.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 3 в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий ВАК и международных баз цитирования для опубликования основных научных результатов

диссертаций, 9 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, списка используемых источников, включающего 187 библиографических источников, и содержит 219 страниц машинописного текста, включая 17 таблиц, 180 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность заведующему кафедрой химии и технологии органического синтеза РХТУ им. Д.И. Менделеева С.В. Попкову и сотрудникам кафедры за помощь в подготовке диссертации, за своевременные и профессиональные консультации на всех этапах.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В литературном обзоре рассмотрены общая характеристика β -агонистов, методы синтеза β -агонистов различных подклассов и их метаболитов, фармакокинетические исследования и пути биотрансформации ряда соединений данного класса, методы анализа целевых соединений и их метаболитов в биологических средах.

1.1 Общая характеристика β -агонистов

Прототипом β -агонистов являются природные нейромедиаторы дофамин и норадреналин, играющие важную роль в нейрогуморальной регуляции обменных процессов в организме теплокровных, и адреналин, выполняющий преимущественно гормональную функцию. Данные соединения, объединяемые общим названием катехоламины, очень близки по строению (рисунок 1.1).

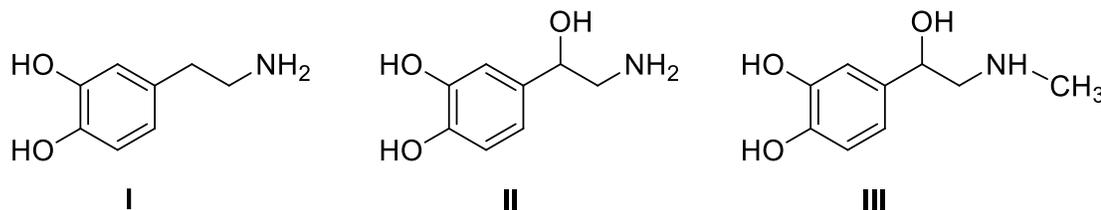


Рисунок 1.1 – Структура природных катехоламинов: I – дофамин, II – норадреналин, III – адреналин

Такое структурное сходство предполагает высокую избирательность рецепторов при связывании с этими эндогенными веществами, однако, нельзя исключать и особенность локализации проводящих путей, обслуживаемых ими нейромедиаторами и гормонами, когда, например, попадание норадреналина в дофаминергические синапсы практически исключено.

Первым выделенным из организма теплокровных катехоламинов стал адреналин, присутствующий во всех типах тканей. Это соединение сыграло важную роль в фармакологии и медицинской химии. Ранее оно использовалось преимущественно для изучения механизма функционирования симпатической нервной системы, нейромедиатором которой является норадреналин. Но вместе с тем получила развитие и

химия фенилэтиламинного структурного элемента адреналина, ставшего отправной точкой для последовавших исследований, целью которых стал поиск новых структурных аналогов гормона с модифицированной активностью и его антагонистов.

В результате исследований биологической активности аналогов адреналина было выявлено два основных типа рецепторов на этот гормон, обладающих неодинаковой чувствительностью к химическим соединениям, – α - и β -адренорецепторы – и несколько подтипов каждого [1-3, 8].

Основные α -адренорецепторы представлены α_1 - и α_2 -адренорецепторами [8]. α_1 -Адренорецепторы локализуются постсинаптически, α_2 -адренорецепторы – пресинаптически и вне синапсов. Физиологическая роль пресинаптических α_2 -адренорецепторов заключается в их участии в системе обратной отрицательной связи, регулирующей высвобождение норадреналина.

Среди пост- и внесинаптических β -адренорецепторов выделяют β_1 -адренорецепторы (например, в сердце), β_2 -адренорецепторы (в бронхах, сосудах, матке) и β_3 -адренорецепторы (в жировой ткани). Вместе с тем во многих тканях сосуществуют разные типы рецепторов. Так, показано, что в сердце человека и ряда животных наряду с β_1 -адренорецепторами имеются β_2 - и β_3 -адренорецепторы. С другой стороны, в бронхах помимо β_2 -адренорецепторов, обнаружены также β_1 -адренорецепторы. В отличие от аналогичных α -адренорецепторов β_2 -адренорецепторы осуществляют положительную обратную связь, стимулируя высвобождение норадреналина.

Стимуляция определенных постсинаптических адренорецепторов сопровождается типичными для их активации эффектами. Так стимуляция α -адренорецепторов способствует сужению сосудов (особенно сосудов кожи, почек, кишечника), сокращению радиальной мышцы радужной оболочки, снижению моторики и тонуса кишечника, сокращению сфинктеров ЖКТ, сокращению капсулы селезенки, сокращению миометрия. В свою очередь, стимуляция β -адренорецепторов приводит к расширению сосудов (особенно сосудов скелетных мышц, печени), повышению частоты и силы сердечных сокращений, снижению тонуса мышц бронхов, снижению моторики и тонуса кишечника, снижению тонуса миометрия, гликогенолизу, липолизу.

Препараты, являющиеся объектом наших исследований, преимущественно влияют на β -адренорецепторы.

Сам адреналин не находит широкого применения в клинической медицине. Его применяют для повышения давления крови при циркуляторном коллапсе и для расслабления бронхиальных мышц при острых приступах астмы и анафилактических реакциях, а также в комплексе с местными обезболивающими средствами в качестве соединения с вазоконстрикторным эффектом для снижения потери крови при небольших хирургических операциях [1]. С другой стороны, β -агонисты адреналина могут применяться в качестве нейростимуляторов, средств с анаболической активностью и средств для «сжигания» жира и отличаются более широким спектром действия.

Большинство β -агонистов, обладающих биологической активностью, имеют общую структуру (рисунок 1.2) [2, 9]:

1. замещенное шестичленное ароматическое кольцо,
2. гидроксильную группу, связанную с углеродом в β -положении в *R*-конфигурации,
3. положительно заряженный атом азота боковой цепи этиламина,
4. объемный заместитель у алифатического атома азота, отвечающий за специфичность по отношению к β -рецептору.

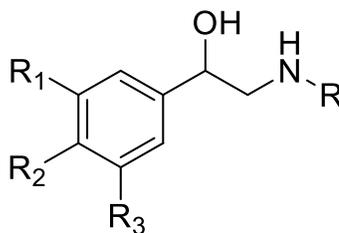


Рисунок 1.2 – Общая структура β -агонистов

Данные элементы идентичны для всех β -агонистов и, за исключением объемного заместителя у алифатического атома азота, также аналогичны для адреналина и норадреналина.

В 1933 году было предположено, что β -адренергические рецепторы связываются с β -агонистами по трем фрагментам молекулы: по β -гидроксильной группе, алифатическому азоту и ароматическому кольцу. Последующие учения показали, что отсутствие или замена какого-либо фрагмента может привести к значительному влиянию на связывание с рецептором и на проявление агонистических свойств. Вариация структуры молекулы

проводится с целью изменения метаболических превращений и, как следствие, для продления активности препаратов, увеличения сродства к α - и β -адренорецепторам, что приводит к изменению фармакокинетических параметров. Поскольку биологическая активность зависит от структуры молекулы, далее будут рассмотрены основные структурные единицы, влияющие на характеристики β -агонистов.

Ароматическое кольцо. Как правило, в качестве заместителей в ароматическом кольце используют гидроксильную, галогеновую, амино-, циано-, гидроксиметильную группы и различные их комбинации. Присутствующие заместители оказывают сильное влияние на продолжительность нахождения β -агонистов в тканях и на эффективность связывания с рецептором.

По типу заместителей в ароматическом кольце β -агонисты могут быть разделены на простые фенолы, катехолы, резорцинолы, салигенины и галогенанилины (таблица 1, рисунок 1.2) [3, 9]. Катехолы имеют общее фенольное кольцо с гидроксильными группами в 3 и 4 положениях и этиламинной группой. Они отличаются от других размером заместителя у атома азота. У резорцинолов гидроксигруппы находятся в 3 и 5 положениях, в то время как у салигенинов только в 4 положении.

Таблица 1 – Группы β -агонистов, классифицированные по наличию заместителей в ароматическом кольце

Группы β -агонистов	Заместители в ароматическом кольце			Примеры
	R ₁	R ₂	R ₃	
Фенолы	-H	-OH	-H	рактопамин, ритодрин
Резорцинолы	-OH	-H	-OH	фенотерол, тербуталин
Катехолы	-OH	-OH	-H	изопротеренол, добутамин
Салигенины	-CH ₂ OH	-OH	-H	сальбутамол, сальметерол
Галогенанилины	Hal	NH ₂	Hal	кленбутерол, бромбутерол

Комбинация заместителей в ароматическом кольце играет важную роль для биологической активности, поскольку гидроксильная группа серина, входящего в состав β -рецептора, вероятно, образует водородную связь с заместителями в *мета*- и *пара*-положениях. Для соединений с гидроксигруппой гидроксильная группа должна быть незамещенной, чтобы проявлять активность.

Алкиламин. Алкильные заместители у аминогруппы способствуют увеличению активности и селективности β -агонистов. Присутствие метильной группы у атома азота норадреналина приводит к гормону адреналину. Адреналин обладает гораздо более высоким сродством к β_2 -адренорецептору, чем норадреналин. Увеличение размера заместителя повышает селективность молекулы по отношению к β_2 -адренорецептору, в то время как уменьшает по отношению к α -адренорецептору. Таким образом, группа, расположенная рядом с алифатическим азотом, во всех случаях объемная и обычно представлена *трет*-бутильной, изопропильной, фенилалкильной группами или гидроксифенильной группой. Поскольку алифатические амины, присутствующие в структуре β -агонистов, имеют щелочной рКа, в крови и тканях они находятся в протонированной форме при физиологическом рН, равном 7.4. Например, рКа для фенотерола 8.5 или 10, для изопротеренола 10.1, для рактопамина 9.4, для сальбутамола 9.3, для тербуталина 10.1. Если β -агонист не ионизирован, то он не будет проявлять биологическую активность. Даже если β -агонист принимается в форме свободного основания, после приема с пищей в желудке он протонируется в форму соли и попадает в кровь. Таким образом, константа диссоциации алифатического азота общая для всех β -агонистов и обуславливает то, что молекула не распадется в жировой ткани, если только другие фрагменты этой же молекулы не обладают значительной липофильностью, чтобы взаимодействовать с жиром.

Коммерчески доступные соли β -агонистов не обладают высокой липофильностью и почти нерастворимы в неполярных растворителях, таких как метиленхлорид, этилацетат и эфир. Данные соединения легко растворяются в воде и в метиловом спирте.

β -Агонисты в виде свободных оснований являются липофильными, что возможно приводит к широко распространенному ошибочному мнению, что данные соединения в основном накапливаются в жировой ткани. Липофильные свойства β -агонистов в виде свободных оснований используются во время анализа данных соединений в тканях и пищевых продуктах. Представляющие интерес аналиты в виде солей, находящиеся в водных матрицах, переводятся в форму свободных оснований за счет приведения рН матрицы к 10 или выше щелочами, и β -агонисты экстрагируются из водных растворов такими растворителями, как этилацетат, эфир или метиленхлорид.

β -Гидроксильная группа. Большинство агонистов β -адренорецепторов имеют гидроксильную группу у атома углерода в β -положении. Данный атом углерода является хиральным, что приводит к присутствию левовращающегося и правовращающегося стереоизомеров в коммерческих препаратах (в отношении 1:1). Что касается рецептора, то соответствующая ориентация гидроксильной группы в β -положении оказывает существенное влияние на биологическую активность. Для β -адренергических агонистов прямого действия биологическая активность связана исключительно с левовращающимся стереоизомером. В то время как «неактивные» стереоизомеры некоторых соединений могут и не быть лишены биологической активности, дистомеры (неактивные, либо обладающие слабой активностью энантиомеры) β -агонистов обычно на порядок менее активны, чем левовращающиеся изомеры, особенно это касается β -агонистов прямого действия. Более того, дистомер может препятствовать активности более биологически активных изомеров (эутомеров) путем конкурентного ингибирования. Таким образом, дистомер может потенциально связываться с участками, отличными от основного рецептора, тем самым потенциально способствовать противоположному эффекту или изменять распределение и / или активность эутомера, приводя к снижению или увеличению эффекта или токсичности.

Наличие заместителей у атома углерода этиламина в α -положении приводит к блокировке метаболизма путем окисления моноаминооксидазой (МАО), что увеличивает период полураспада молекулы.

1.2 Методы синтеза β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов

В данном разделе рассмотрены способы синтеза β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов.

1.2.1 Синтез кленбутерола, кленпроперола и кленпентерола

Кленбутерол один из самых известных и широко применяемых препаратов класса β -агонистов. Данное соединение является селективным агонистом β_2 -адренорецепторов

бронхов и оказывает бронхорасширяющее действие. Также данное соединение оказывает умеренное непосредственное спазмолитическое действие на бронхиальную мускулатуру, угнетает сократительную деятельность матки. Основное применение кленбутерол имеет в качестве бронхорасширяющего средства при бронхиальной астме, астматическом бронхите, эмфиземе легких, разных бронхоспастических состояниях [1, 10]. Кленбутерол за счет своей способности увеличивать мышечную массу находит широкое применение в сельскохозяйственных целях в качестве кормовой добавки для увеличения привеса у крупного рогатого скота. Кленпроперол и кленпентерол, ближайшие гомологи кленбутерола, также являются селективными β_2 -агонистами.

В литературных источниках удалось обнаружить несколько альтернативных способов синтеза кленбутерола. Согласно американскому патенту [11], 4-нитро-2'-бромацетофенон вводили во взаимодействие с *трет*-бутиламином с дальнейшим восстановлением нитрогруппы бензольного кольца (рисунок 1.3). Продукт восстановления хлорировали и полученный 3,5-дихлор-4-аминофенил-*трет*-бутиламинкетон обрабатывали борогидридом натрия с образованием целевого кленбутерола. Необходимый для этих превращений бромацетофенон был получен в результате реакции бромирования 4-нитроацетофенона бромом. Аналогичным образом был получен кленпроперол.

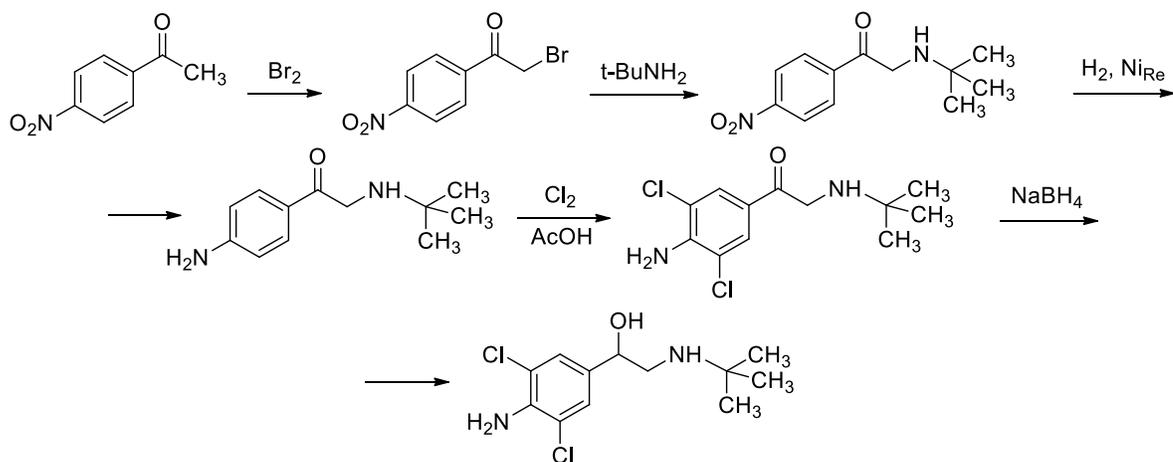


Рисунок 1.3 – Схема получения кленбутерола по Кеку (Способ 1)

Этими же авторами предложен альтернативный способ синтеза кленбутерола (рисунок 1.4) [12]. Согласно данному методу, 2-*трет*-бутиламино-1-арилэтанол обрабатывали азотной кислотой и продукт нитрования вводили во взаимодействие с фосгеном. В полученном 3-*трет*-бутил-5-(4-нитрофенил)-1,3-оксазолидин-2-оне

восстанавливали нитрогруппу до аминогруппы. Продукт восстановления хлорировали и в результате последующего щелочного гидролиза был получен кленбутерол.

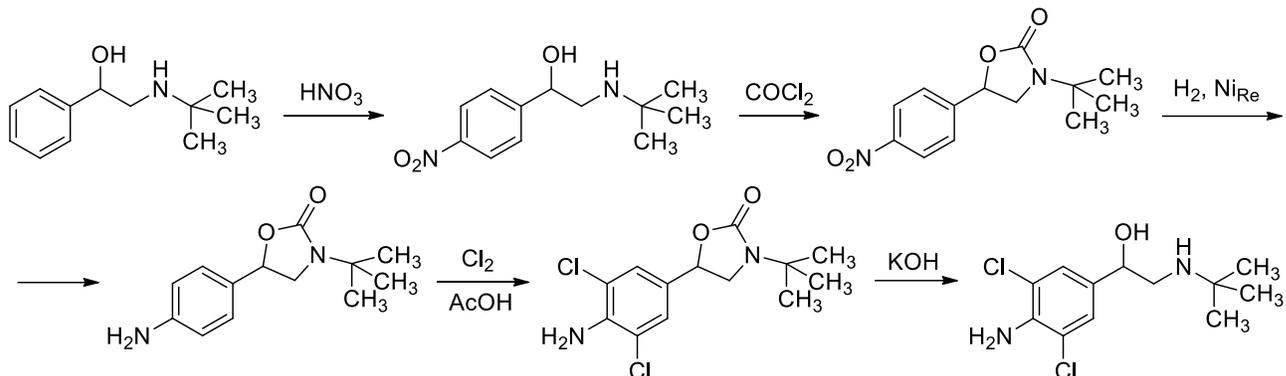


Рисунок 1.4 – Схема получения кленбутерола по Кеку (Способ 2)

В немецком патенте [13] предложен способ получения оптически активного (*R*)-кленбутерола (рисунок 1.5). Согласно данной схеме на первом этапе получали 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанон путем хлорирования 4-аминоацетофенона с последующим бромированием полученного дихлорпроизводного, выход продуктов составил 52 % и 21 %, соответственно. На следующем этапе в полученном бромацетофеноне кето-группу восстанавливали до спиртовой с использованием кофермента никотинамидадениндинуклеотида. В ходе реакции был получен оптически активный спирт. На заключительной стадии алкилирования *трет*-бутиламина бромгидрином, с выходом 24 % был синтезирован (*R*)-кленбутерол.

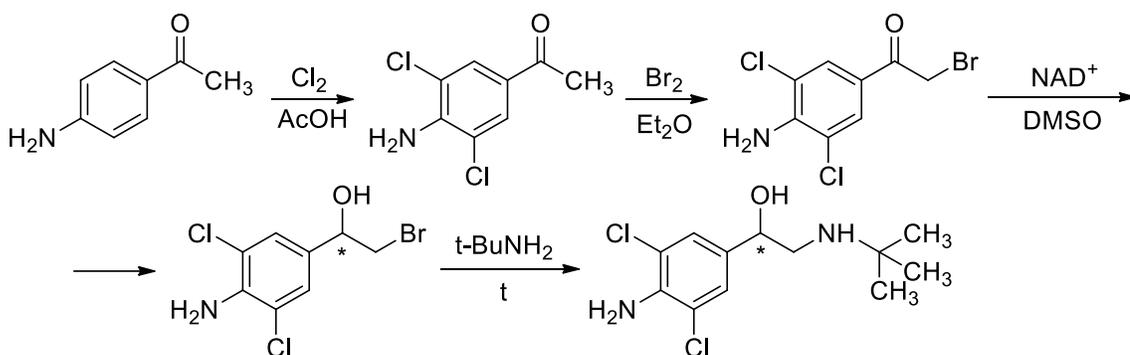


Рисунок 1.5 – Схема получения оптически активного (*R*)-кленбутерола

В более поздних патентах [14, 15] предложен способ получения кленбутерола, согласно которому исходный 4-амино-3,5-дихлорацетофенон окисляли до соответствующего альдегида действием оксида селена (IV) (рисунок 1.6). Полученный

альдегид конденсировали с *трет*-бутиламином и синтезированный продукт восстанавливали борогидридом натрия.

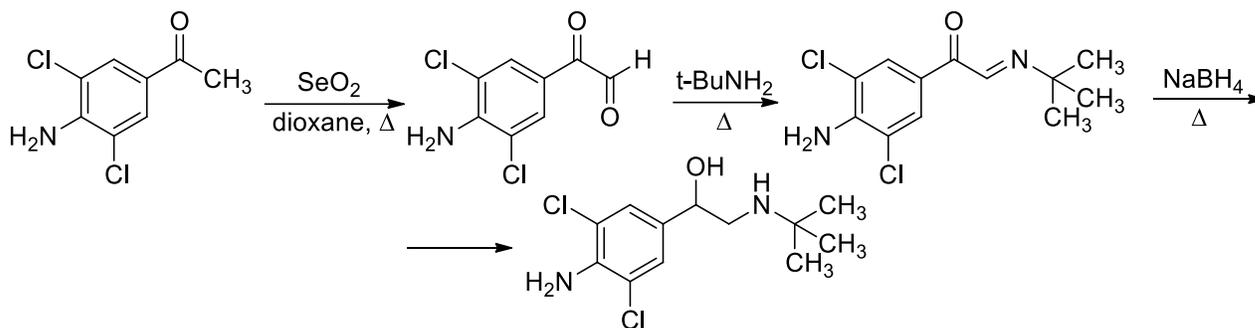


Рисунок 1.6 – Схема получения кленбутерола по Редди

1.2.2 Синтез бромбутерола

Бромбутерол является селективным агонистом β_2 -адренорецепторов. При поиске методов синтеза бромбутерола были найдены два источника, в которых достаточно подробно описаны способы получения данного β -агониста. В статье бразильских авторов предложена четырехстадийная схема получения бромбутерола [16] (рисунок 1.7). Согласно данному источнику, 4-аминоацетофенон вводили во взаимодействие с тремя эквивалентами триметилфениламмонийтрибромида, что способствовало образованию циклического ацетала бромацетофенона и предотвращению образования продукта дибромирования в α -положении по отношению к карбонильной группе. После гидролиза промежуточного соединения соляной кислотой была получена смесь 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона и 4-амино-3,5-дибром-2-хлорацетофенона с выходом 79 % в соотношении 1:1 по данным ЯМР-спектроскопии. Далее карбонильную группу полученных кетонов восстанавливали до спиртовой действием борогидрида натрия с получением смеси бромгидрина и хлоргидрина в соотношении 1:1 с количественным выходом. Бромбутерол с выходом 98 % был получен в результате реакции смеси галогенгидринов с избытком *трет*-бутиламина.

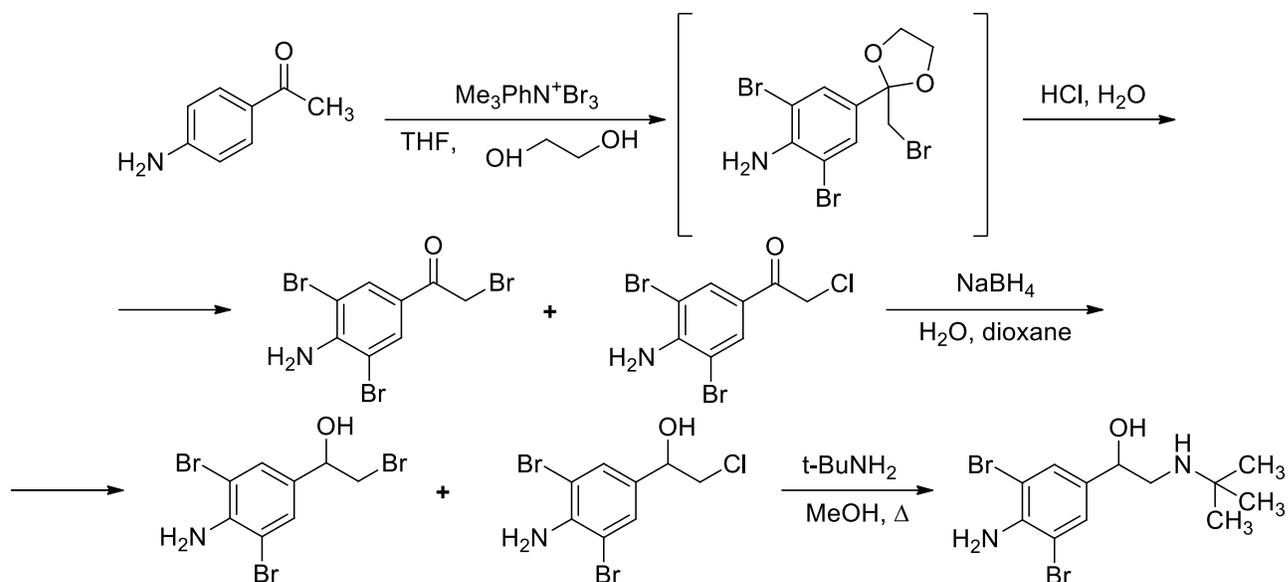


Рисунок 1.7 – Схема получения бромбутерола по Нери

Авторы утверждают, что при бромировании 4-аминоацетофенона тремя эквивалентами молекулярного брома в уксусной кислоте, диоксане или хлороформе, а также при бромировании бромидом меди (II) в этилацетате после выделения была получена смесь продуктов, в которой преобладало исходное соединение.

В более позднем патенте [30] наряду с синтезом кленбутерола представлена аналогичная схема синтеза бромбутерола (рисунок 1.8). Введение атомов брома в бензольное кольцо осуществляли с использованием N-бромсукцинимид. Выход продукта на каждой стадии составил 80 %, 71 % и 33 %, соответственно.

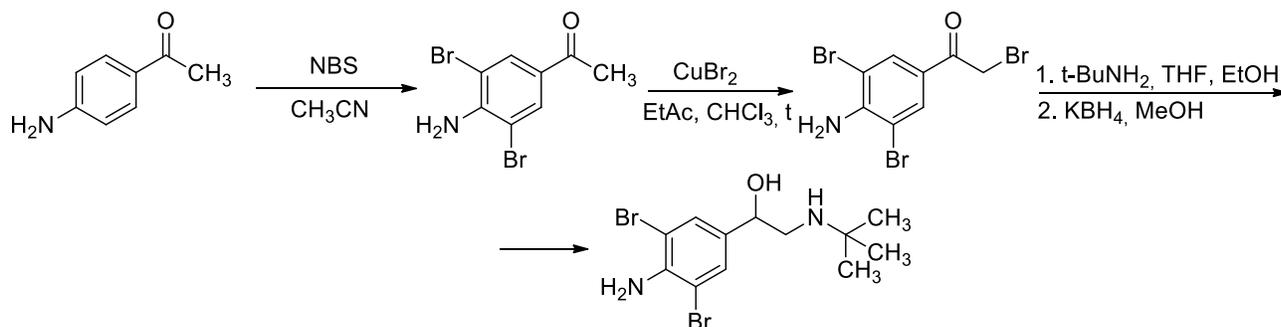


Рисунок 1.8 – Схема получения бромбутерола по Вангу

1.2.3 Синтез тулобутерола

Тулобутерол является селективным агонистом β_2 -адренорецепторов, который оказывает сильное и продолжительное расширяющее действие на гладкую мускулатуру бронхов и используется для профилактики и лечения бронхита и астмы [17]. В 1981 году тулобутерол был одобрен в качестве противоастматического препарата в Великобритании. С 2009 года тулобутерол применяется в качестве симпатомиметического компонента трансдермальных пластырей для лечения обструктивных заболеваний бронхов [18].

В ходе литературного поиска была найдено несколько источников, посвященных синтезу тулобутерола. Согласно статье японских авторов его получали двумя способами [19]. По первому способу, исходный 2-хлорацетофенон после окисления действием оксида селена до соответствующего альдегида конденсировали с *трет*-бутиламином, а далее полученный имин восстанавливали с борогидридом натрия до целевого тулобутерола с выходом 72 % на заключительной стадии (рисунок 1.9).

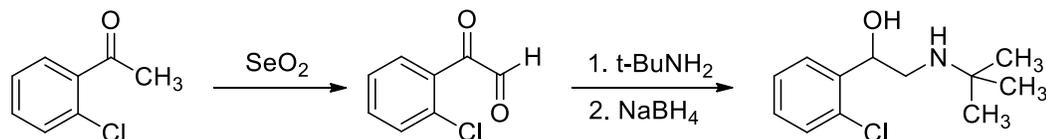


Рисунок 1.9 – Схема получения тулобутерола по Кошинаку (Способ 1)

По второму способу, исходный 2-хлорацетофенон бромировали с образованием 2'-бром-2-хлорацетофенона, который затем восстанавливали борогидридом натрия до бромгидрина, превращающегося в 2-(2-хлорфенил)оксиран после обработки щелочью (рисунок 1.10). Раскрытие последнего *трет*-бутиламином привело к целевому тулобутеролу.

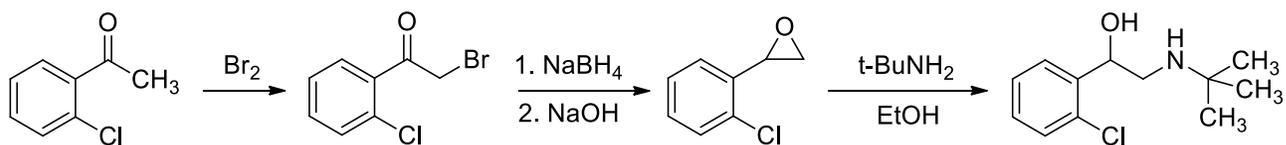


Рисунок 1.10 – Схема получения тулобутерола по Кошинаку (Способ 2)

Аналогичная схема синтеза представлена в статье [20], выход тулобутерола на конечном этапе составил 40 %.

В китайском патенте [21] предложен альтернативный способ получения тулобутерола. На первом этапе из 1-(2-хлорфенил)этанола получали 2-хлорстирен, который окисляли до соответствующего оксирана (рисунок 1.11). Раскрытие оксирана *трет*-бутиламином привело к тулобутеролу. Суммарный выход на три стадии синтеза составил 68 %.



Рисунок 1.11 – Схема получения тулобутерола по Жингу

Аналогичная схема превращений представлена в патентах одних и тех же авторов [22, 23]. 2-Хлорстирен превращали в бромгидрин, которым алкилировали *трет*-бутиламин. Выход тулобутерола составил 77–82 %.

В патенте [24] описана еще одна схема получения тулобутерола. Согласно данному способу изначально 2-хлорацетофенон бромировали N-бромсукцинимидом с образованием смеси монобромпроизводного (75–80 %) и дибромпроизводного (10–15 %). Затем полученной смесью алкилировали *трет*-бутиламин и восстанавливали кето-группу до спиртовой с получением тулобутерола с выходом 75 % (рисунок 1.12).

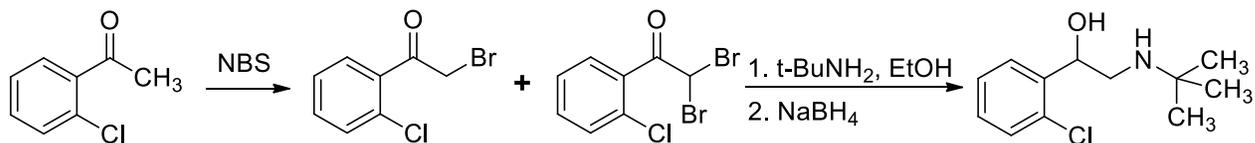


Рисунок 1.12 – Схема получения тулобутерола по Ву

1.2.4 Синтез 4-гидрокситулобутерола

4-Гидрокситулобутерол – селективный β_2 -агонист, сравнительно недавно появившийся на рынке лекарственных средств под названием мелуадрин тартрат в виде *R*-энантиомера [25]. В то же время данное соединение является одним из главных метаболитов тулобутерола, являющийся продуктом его моногидроксилирования [119, 26]. При изучении механизма действия 4-гидрокситулобутерола было показано, что данный

метаболит оказывает более выраженный расслабляющий эффект на трахею морских свинок, чем тулобутерол, и обладает более высокой активностью [17].

В ходе литературного поиска было обнаружено, что в статье, посвященной получению тулобутерола [19], приведен синтез его 4-гидрокси аналога. 4-Гидрокситулобутерол получали тремя альтернативными способами.

По первому способу исходный 4-гидрокси-2-хлорацетофенон после окисления оксидом селена (IV) до соответствующего альдегида конденсировали с *трет*-бутиламином, а далее полученный имин восстанавливали с помощью борогидрида натрия до целевого соединения (рисунок 1.13).

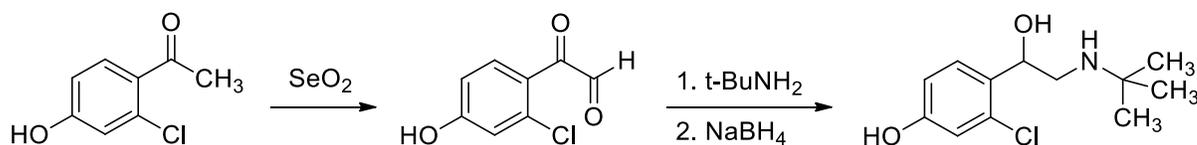


Рисунок 1.13 – Схема получения 4-гидрокситулобутерола по Кошинаку (Способ 1)

По второму способу аналогичные превращения проводили, начиная с 4-бензилокси-2-хлорацетофенона: первоначально его окисляли оксидом селена (IV), затем конденсировали промежуточный кето-альдегид с *трет*-бутиламином и восстанавливали имин борогидридом натрия (рисунок 1.14). На заключительной стадии бензильную защиту снимали гидролизом бромистоводородной кислотой.

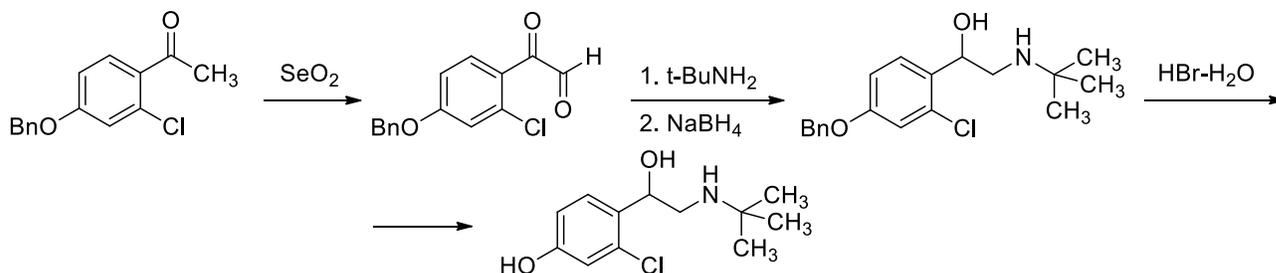


Рисунок 1.14 – Схема получения 4-гидрокситулобутерола по Кошинаку (Способ 2)

По третьему способу в качестве исходного соединения использовали 4-нитро-2-хлорацетофенон (рисунок 1.15). В результате двух аналогичных превращений действием оксида селена (IV) с последующей конденсацией с *трет*-бутиламином и восстановлением борогидридом натрия был получен 4-нитроаналог тулобутерола. В результате его восстановления *in situ* атомарным водородом, выделяющимся при растворении цинка в

соляной кислоте, получали 4-аминопроизводное, которое в результате диазотирования и разложения соли диазония превращали в целевой 4-гидрокситулобутерол.

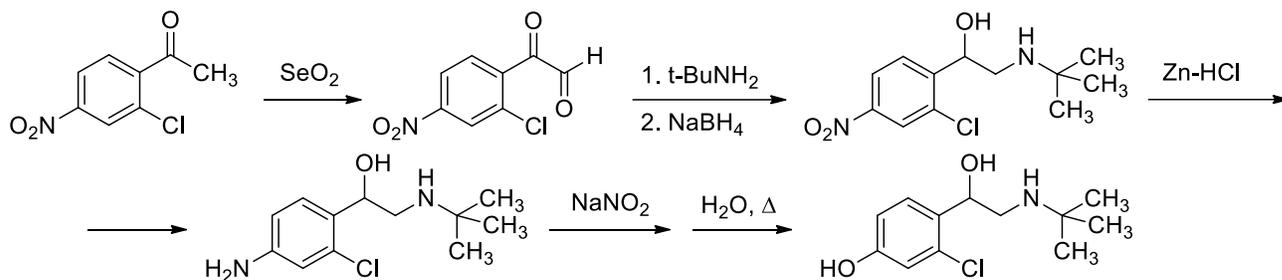


Рисунок 1.15 – Схема получения 4-гидрокситулобутерола по Кошинаку (Способ 3)

На конечных стадиях трех альтернативных способов синтеза выход 4-гидрокситулобутерола составил 35 %, 72 % и 78 %, соответственно.

1.2.5 Синтез циматерола и цимбутерола

Циматерол и цимбутерол – селективные агонисты β_2 -адренорецепторов. Циматерол является одним из наиболее часто применяемых препаратов данной группы в качестве стимулятора привесов у сельскохозяйственных животных.

В ходе литературного поиска была обнаружена схема синтеза циматерола [27]. Согласно данному источнику, 2-ациламинобензонитрил ацилировали хлорацетилхлоридом и полученным хлорацетофеноном алкилировали изопропиламин (рисунок 1.16). Восстановление кето-группы до спиртовой и последующее снятие ацетильной защиты привели к целевому циматеролу.

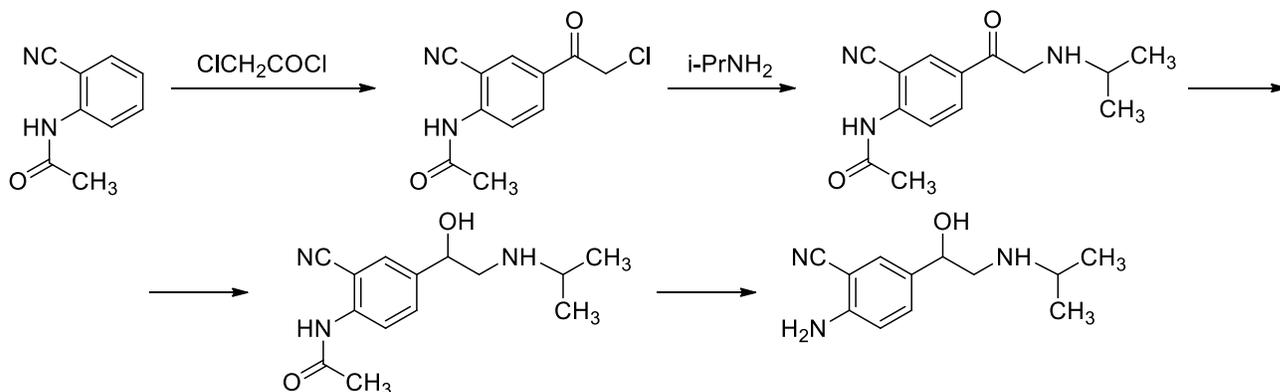


Рисунок 1.16 – Схема получения циматерола по Ледникеру

Авторами представлена только схема процесса, но нет данных об условиях проведения реакций, выходе продуктов и физико-химических характеристиках синтезированных соединений.

При поиске способов получения цимбутерола была найдена пятистадийная схема синтеза как самого соединения, так и его дейтерированного аналога [28, 29]. Согласно данной методике, 4-аминоацетофенон бромировали N-бромсукцинимидом с образованием 4-амино-3-бромацетофенона с выходом 94 % (рисунок 1.17). Затем в полученном соединении атом брома замещали на цианогруппу (выход – 58 %) и синтезированный ацетофенон обрабатывали бромидом меди с выходом продукта 74 %. 2'-Бром-4-амино-3-цианоацетофеноном алкилировали *трет*-бутиламин и в полученном кетоне восстанавливали кето-группу до спиртовой действием борогидрида натрия с образованием цимбутерола. Выход продукта на конечной стадии составил 43 %. Суммарный выход целевого циматерола составил 17 %.

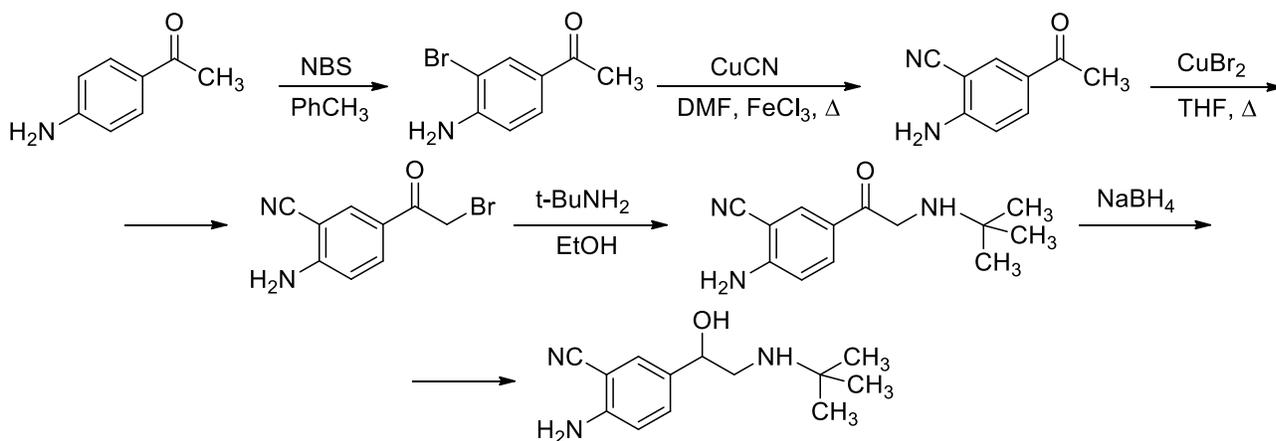


Рисунок 1.17 – Схема получения цимбутерола по Асато

Аналогичная схема синтеза циматерола и цимбутерола предложена в раннее упомянутом китайском патенте [30]. Для замещения атома брома на цианогруппу использовали гексацианоферрат калия (III) в присутствии тетрафенилфосфина палладия, выход продукта составил 30 %.

1.2.6 Синтез изопротеренола

Изопротеренол (изадрин, изопреналин) – неизбирательный β -агонист, оказывает влияние как на β_1 -, так и на β_2 -адренорецепторы. Данное соединение оказывает сильный бронхорасширяющий эффект, вызывает учащение и усиление сердечных сокращений. Вместе с тем, уменьшает общее периферическое сопротивление сосудов и снижает артериальное давление. Под влиянием препарата несколько расширяются сосуды брюшной полости, кожи, слизистых оболочек (носа), происходит торможение сокращений матки, могут наблюдаться и другие эффекты, связанные с возбуждением β -адренорецепторов [1].

В литературе представлены несколько способов получения изопротеренола. Впервые двухстадийный синтез данного соединения описан в американском патенте [31]. Согласно данному источнику, 3,4-дигидрокси-2'-хлорацетофенон кипятили с раствором изопропиламина, выход продукта составил 50 % (рисунок 1.18). Изопротеренол был получен на следующей стадии в результате каталитического гидрирования синтезированного аминокетона. Выход целевого соединения не указан.

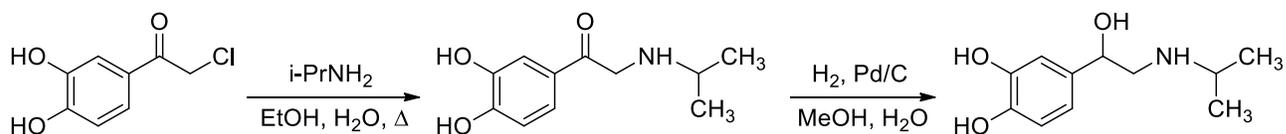


Рисунок 1.18 – Схема получения изопротеренола по Шеингу

Аналогичная схема получения изопротеренола предложена в источнике [32], выход изопротеренола – 78 %. Реакцию восстановления кето-группы до спиртовой в аминокетоне проводили водородом на 10 %-ном палладии на угле при давлении 50 атм.

В патентах [33–36] описана схема синтеза изопротеренола с такими же ключевыми стадиями, что и в предыдущем способе. Необходимые для данных превращений 3,4-дигидрокси-2'-галогенацетофеноны, 3,4-дигидрокси-2'-аминоацетофенон были получены в результате реакции катехола с хлоруксусной кислотой или бромацетилбромидом, или аминуксусной кислотой (рисунок 1.19).

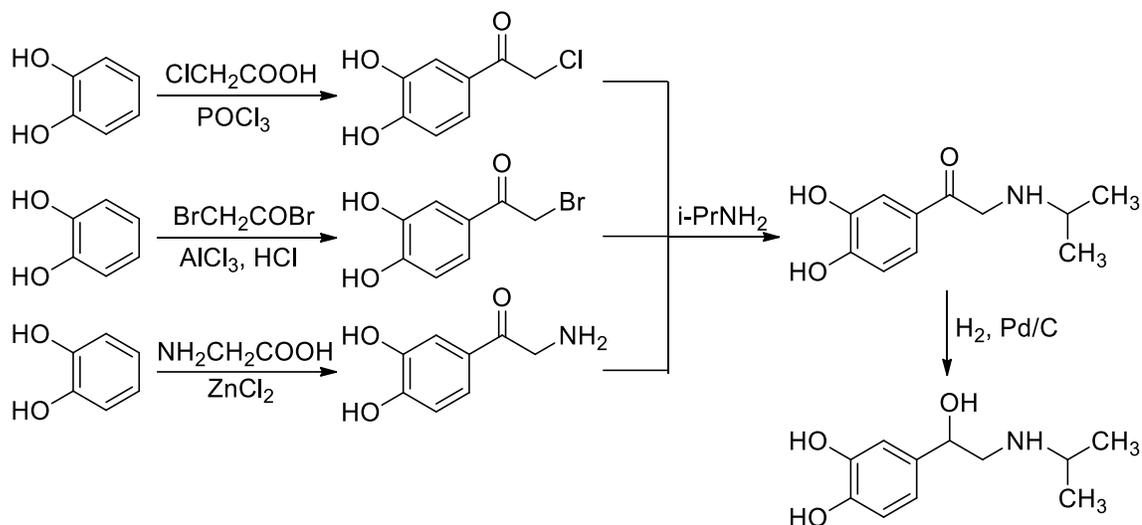


Рисунок 1.19 – Схема получения изопротеренола по Луну

Известно, что *R*-форма изопротеренола примерно в 90 раз активнее его *S*-формы [37]. В связи с этим, были предложены селективные способы синтеза *R*-энантиомера. Так Корей и Линк разработали шестистадийную схему получения данной формы [38]. Вначале из коммерчески доступного 3,4-дигидрокси-2'-хлорацетофенона с выходом 96 % был получен защищенный кетон, который затем восстанавливали бораном до соответствующего хлоргидрина (рисунок 1.20). В результате реакции последнего с йодидом натрия был получен соответствующий йодгидрин. Далее взаимодействием с триэтилхлорсиланом был получен защищенный спирт, которым алкилировали изопропиламин, что привело к образованию кремний-защищенного изопротеренола. Изопротеренол был получен в результате реакции последнего с фторидом калия.

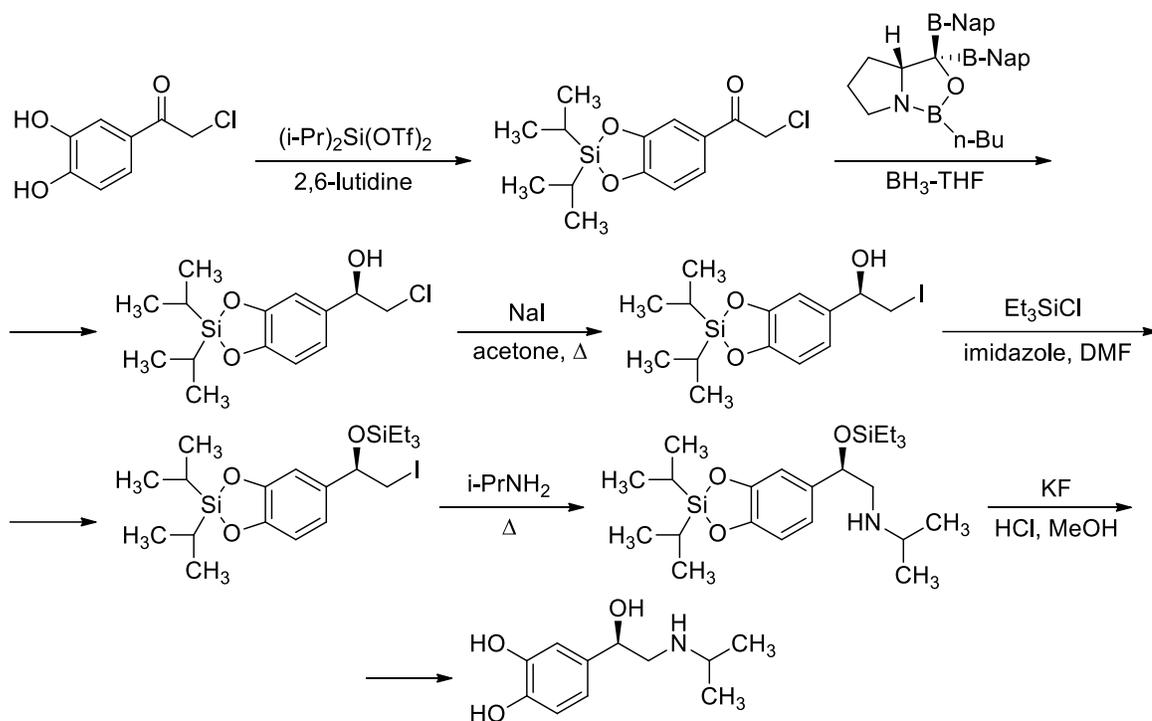


Рисунок 1.20 – Схема получения (*R*)-изопротеренола по Корею и Линку

В источнике [39] авторы предложили синтезировать *R*-энантиомер изопротеренола по шестистадийной схеме. В качестве исходного соединения был использован коммерчески доступный 3,4-диметоксибензальдегид (рисунок 1.21). Данное соединение было подвергнуто олифенированию по реакции Виттига с использованием метилентрифенилфосфорана, полученному в результате реакции трифенилметилфосфоний йодида и *n*-бутиллития. В результате был синтезирован стирол с выходом 90 %. Дигидроксилирование полученного стирола при условиях асимметричного дигидроксилирования Шарплесса привело к диолу с выходом 97 %. Селективный перевод первичной гидроксигруппы в тозилат был проведен с использованием тозилхлорида с выходом продукта 95 %. Затем авторы пытались синтезировать целевой изопротеренол по реакции нуклеофильного замещения тозилата с изопропиламином или через стадию получения оксирана с последующим раскрытием цикла изопропиламином. Но данные попытки не принесли удовлетворительных результатов. По этой причине было проведено нуклеофильное замещение тозилата с йодидом натрия с получением йодгидрина с количественным выходом. На следующей стадии с выходом 90 % был получен 1-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропиламиноэтанол взаимодействием йодгидрина с

изопропиламинол. Последующее снятие метоксигрупп привело к целевому изопротеренолу с выходом 80 %.

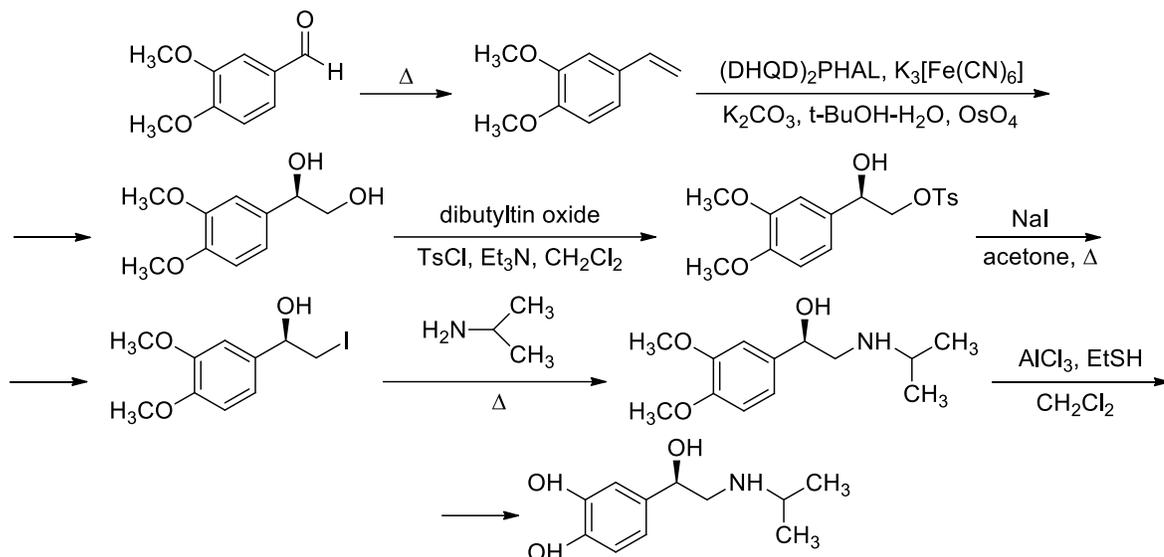


Рисунок 1.21 – Схема получения (*R*)-изопротеренола по Кумару

1.2.7 Синтез метапротеренола и тербуталина

Метапротеренол является стимулятором β_1 - и β_2 -адренорецепторов, но по сравнению с изопротеренолом действует более избирательно на β_2 -адренорецепторы бронхов, чем сердца и сосудов (в меньшей степени вызывает тахикардию и снижение артериального давления) и оказывает более продолжительное бронхорасширяющее действие. Оказывает бронхолитическое и токолитическое действие [1, 40].

Тербуталин преимущественно влияет на β_2 -адренорецепторы, оказывает бронхолитическое и токолитическое действие. Имеются данные об успешном применении данного соединения в виде аэрозоля при хронических обструктивных заболеваниях легких у больных инфарктом миокарда [1].

Впервые синтез метапротеренола описан в бельгийском патенте [41] и его британском аналоге фирмы «С.Н. Boehringer Sohn of Ingelheim am Rhein» [42], посвященным различным способам получения данного соединения.

По первой предложенной схеме целевой продукт получали в результате восстановления соответствующего кетона водородом на никеле Ренея (рисунок 1.22).

После добавления серной кислоты в этаноле был получен сульфат метапротеренола с выходом 83 %.

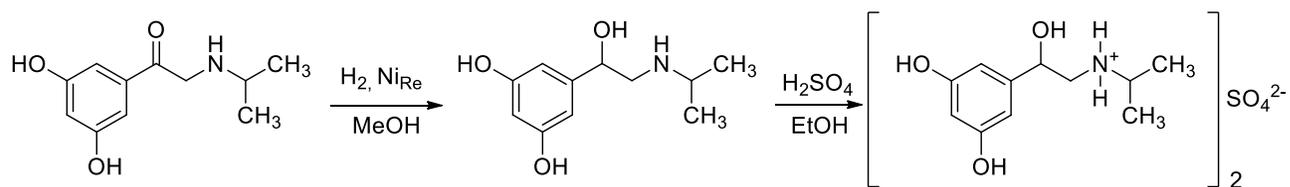


Рисунок 1.22 – Схема получения метапротеренола по Боерингеру (Способ 1)

По второму способу гидробромид метапротеренола получали в результате трехстадийного превращения из 3,5-диметоксиацетофенона (рисунок 1.23). На первой стадии ацетофенон окисляли диоксидом селена (IV) до соответствующего глиоксаля с выходом продукта 75 %. Последующая его конденсация с изопропиламином и восстановление водородом на никеле Ренея привели к гидрхлориду 1-(3,5-диметоксифенил)-1-гидрокси-2-изопропиламиноэтана с выходом 66 %. На заключительной стадии при кипячении со смесью бромоводородной кислоты и уксусного ангидрида с выходом 63 % был получен гидробромид метапротеренола. Суммарный выход целевого продукта составил 31 %.

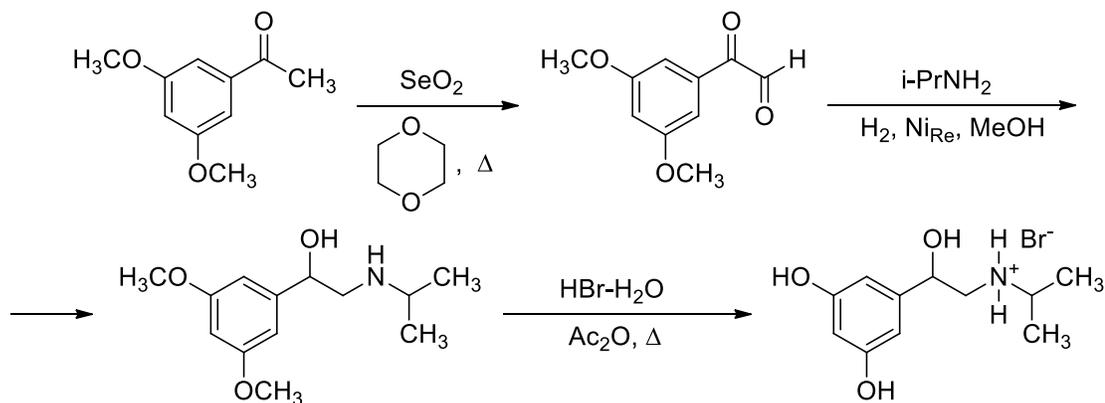


Рисунок 1.23 – Схема получения метапротеренола по Боерингеру (Способ 2)

В третьей цепочке превращений в качестве исходного соединения был использован 3,5-диметокси-2'-бромацетофенон (рисунок 1.24). Вначале его восстанавливали по Меервейну-Понндорфу-Верлею изопропанолом с выходом 60 % до соответствующего бромгидрина. Далее при взаимодействии его со спиртовым раствором гидроксида калия с выходом 82 % был получен 3,5-диметоксифенилоксиран. Оксирановый цикл был раскрыт изопропиламином с выходом продукта 67 %. На заключительной стадии, аналогично

второму способу, были сняты защитные метоксигруппы и получен гидробромид метапротеренола с суммарным выходом 21 %.

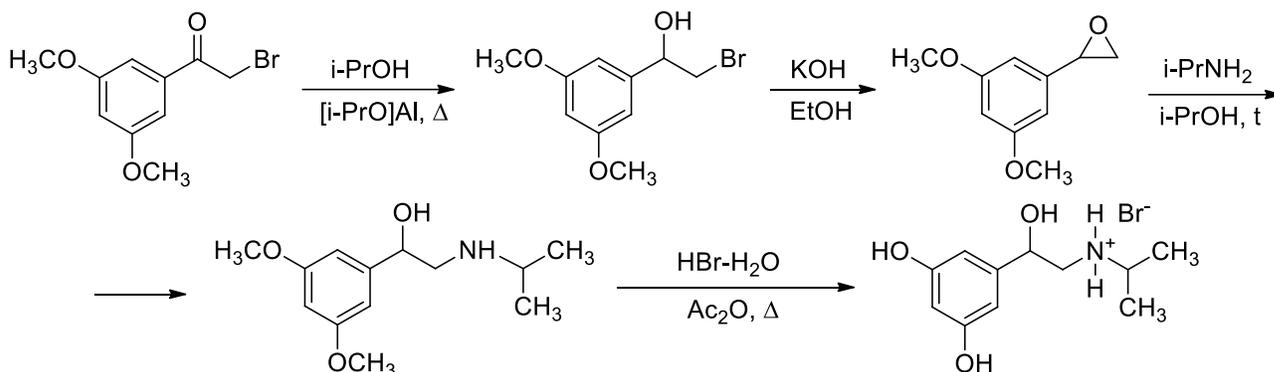


Рисунок 1.24 – Схема получения метапротеренола по Боерингеру (Способ 3)

Впервые синтез тербуталина описан в американском патенте шведской фирмы «Aktiebolaget Draco» [43]. Авторы предложили несколько схем синтеза данного соединения. Стоит отметить, что в качестве защиты чаще всего была использована бензильная и в единственном случае ацетильная группы. Для промежуточных соединений приведены т. пл., но нет данных о выходе продуктов ни на одной стадии.

По первой предложенной схеме целевой продукт получали в две стадии (рисунок 1.25). На первой стадии конденсировали 3,5-дибензилоксибензил-2'-оксоацетальдегид с *трет*-бутиламином, а затем восстанавливали промежуточный имин водородом на никеле Ренея до тербуталина.

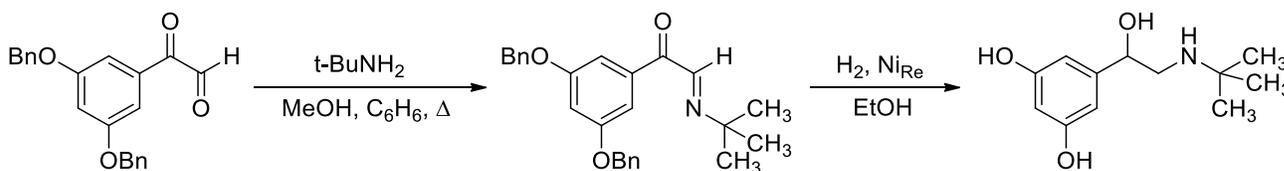


Рисунок 1.25 – Схема получения тербуталина по Веттерлину (Способ 1)

Аналогичный метод синтеза описан в патенте [44]. Исходный оксоацетальдегид был получен из 3,5-дибензилоксиацетофенона действием оксида селена (IV).

По второй цепочке превращений в качестве исходного соединения использовали 3,5-дибензилоксибензилоксиран, который раскрывали *трет*-бутиламином (рисунок 1.26). На заключительной стадии бензильная защита была снята в условиях, описанных в первом способе.

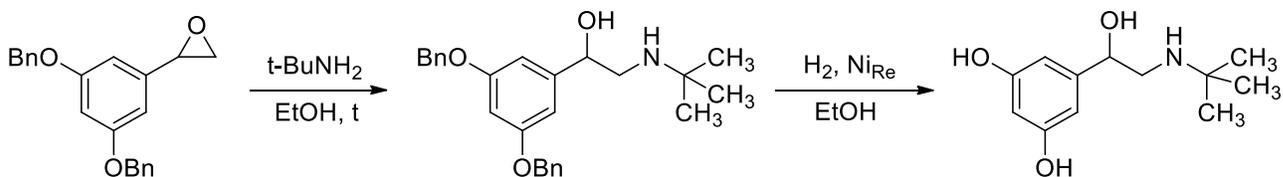


Рисунок 1.26 – Схема получения тербуталина по Веттерлину (Способ 2)

По третьему способу по реакции нуклеофильного замещения бензил-*tert*-бутиламин алкилировали 3,5-дибензилоксифенил-2'-бромацетофеноном (рисунок 1.27). Полученный продукт растворяли в ледяной уксусной кислоте и при восстановлении водородом на 10 %-ном палладии на угле, проводили одновременное O- и N-дебензилирование и восстановление кето-группы до спиртовой. Необходимый для этих превращений бромацетофенон был получен двумя способами: в результате бромирования 3,5-дибензилоксиацетофенона молекулярным бромом в хлороформе или в диэтиловом эфире, либо при бромировании бромидом меди (II) в кипящей смеси этилацетата с хлороформом.

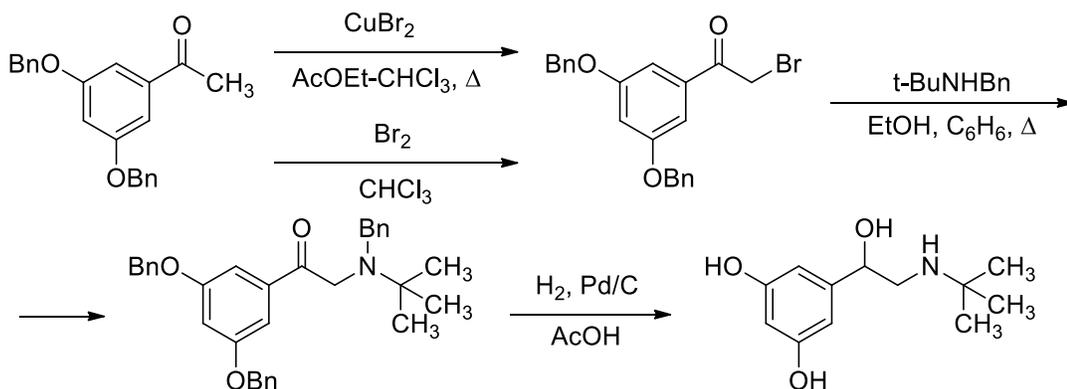


Рисунок 1.27 – Схема получения тербуталина по Веттерлину (Способ 3)

Подобная схема синтеза с небольшим отличием предложена в 2019 году китайскими учеными [45]. В промежуточном бензилированном аминокетоне сначала восстанавливали кето-группу до спиртовой действием борогидрида натрия, а затем проводили дебензилирование полученного спирта.

По четвертому способу в качестве исходного использовали соединение, содержащее ацетильные защитные группы (рисунок 1.28). 3,5-Диацетокси-2'-бромацетофеноном алкилировали бензил-*tert*-бутиламин. N-дебензилирование и восстановление кето-группы до спиртовой проводили водородом при катализе палладием на угле. Снятие

ацетильных групп проводили кипячением в бромистоводородной кислоте с получением гидробромида тербуталина.

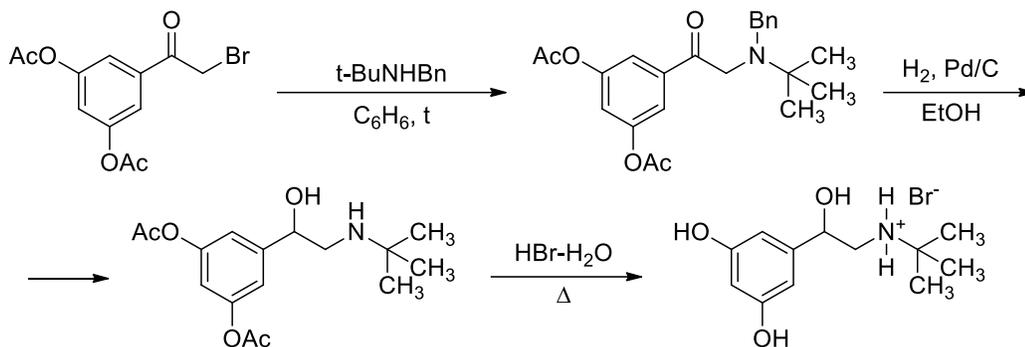


Рисунок 1.28 – Схема получения тербуталина по Веттерлину (Способ 4)

Начальные превращения для третьего способа синтеза тербуталина, а также получение исходного оксирана для второго способа приведены в статье, посвященной получению широко используемого β_2 -агониста фенотерола [46]. Синтез исходного для второго способа получения тербуталина 3,5-дибензилоксифенилоксирана по реакции Кори-Чайковского из соответствующего бензальдегида приведен в статье Альбрехта и Лога [47].

Из двух оптических изомеров тербуталина *R*-изомер проявляет свойства стимулятора β_2 -адренорецепторов, в то время как *S*-изомер вызывает повышенную гиперактивность [48]. Получению оптически чистого изомера посвящена статья японских ученых [49]. На первой стадии гидроксигруппы исходного 3,5-дигидрокси-2'-бромацетофенона были защищены метоксиметильными группами с одновременным превращением бромпроизводного в хлорацетофенон с выходом 83 % (рисунок 1.29). Энзиматическим восстановлением с применением микроорганизмов *Williopsis californica* JCM 3600 3,5-бис(метоксиметил)-2'-хлорацетофенона был получен оптически активный хлоргидрин с чистотой 99,2 % с выходом продукта 80 %. Одновременно с этим рацемический хлоргидрин был получен путем восстановления хлорацетофенона борогидридом натрия с выходом 77 %. Дегидрохлорирование хлоргидрина в присутствии водного гидроксида натрия и тетрабутиламмоний йодида привело с высоким выходом 96 % к соответствующему 3,5-бис(метоксиметил)фенилоксирану. Цикл оксирана был раскрыт *tert*-бутиламином с выходом продукта 77 %. Последующее снятие защитной группы проводили концентрированной соляной кислотой с получением целевого гидрохлорида *R*-изомера тербуталина с выходом 99 %. Суммарный выход продукта составил 49 %.

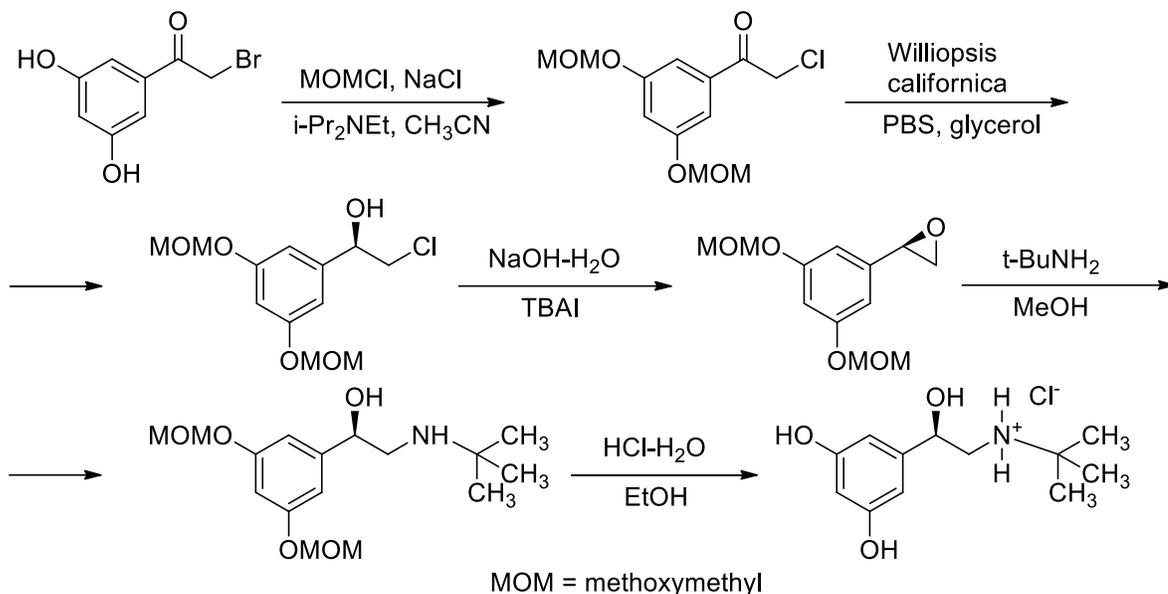


Рисунок 1.29 – Схема получения (*R*)-тербуталина по Такетоми

В более позднем патенте китайских ученых [50] предложена трехстадийная схема получения тербуталина. На первом этапе 3,5-дигидроксиацетофенон обрабатывали бромидом меди (II) с получением α -бромпроизводного (рисунок 1.30). Затем в полученном кетоне кето-группу восстанавливали борогидридом натрия и замещенным спиртом алкилировали *трет*-бутиламин.

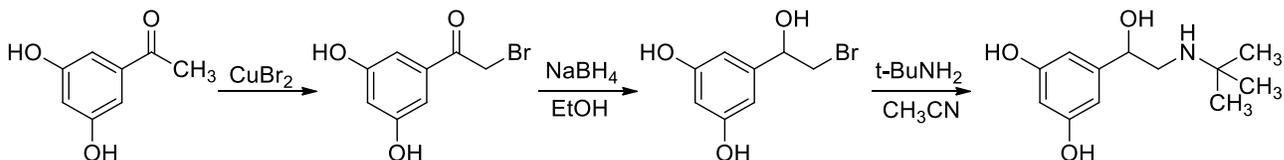


Рисунок 1.30 – Схема получения тербуталина по Лиу

В источнике [51] описана пятистадийная схема получения тербуталина. Изначально ацетофенон нитровали азотной кислотой с получением 3,5-динитроацетофенона (рисунок 1.31). Затем полученный замещенный ацетофенон обрабатывали бромистоводородной кислотой и полученным продуктом алкилировали *трет*-бутиламин с последующим восстановлением кето-группы до спиртовой. На следующем этапе нитрогруппу восстанавливали до аминогруппы и полученный амин вступал в реакцию с нитритом натрия в кислых условиях с получением тербуталина.

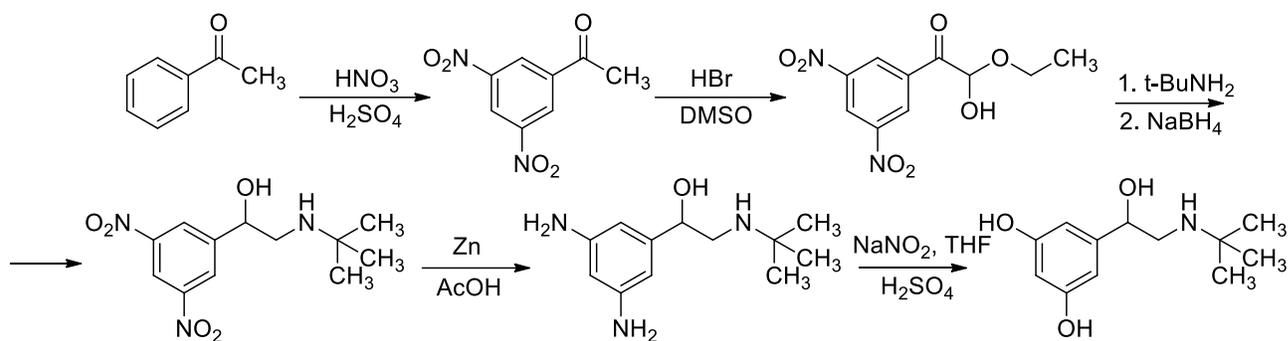


Рисунок 1.31 – Схема получения тербуталина по Вангу

1.2.8 Синтез рактопамина

Рактопамин является стимулятором β_2 -адренорецепторов, находящихся в бронхах, скелетных мышцах, сердце, сосудах, ЦНС, матке и других органах. Обладает анаболическим и липолитическим эффектом, способен расслаблять гладкую мускулатуру, что позволяет использовать его в качестве терапевтического средства как антиастматический агент, но в настоящее время для применения в медицине не зарегистрирован. Рактопамин не обладает избирательностью действия, проявляя тропность к β_1 -, β_2 -, β_3 -адренорецепторам. Может спровоцировать тахикардию и резкий подъем артериального давления, значительную аритмию или ишемию миокарда. Рактопамин – препарат, который в настоящее время применяется в качестве кормовой добавки, способствующий образованию постного мяса у животных. Официально использование рактопамина разрешено в 25 странах.

В статье [52] предложены три способа получения рактопамина. По первому способу изначально получали 1-(4-бензилоксифенил)-2-(3-[4-метоксифенил]-1-метилпропиламино)этанол в результате реакции алкилирования 4-(4-метоксифенил)бутан-2-амина 4-бензилокси-2'-бромацетофеноном (рисунок 1.32). На следующей стадии было осуществлено дебензилирование полученного кетона гидрогенолизом в присутствии палладия на угле. Затем проводили деметилирование 48 %-ной бромоводородной кислотой при кипячении. На заключительной стадии кето-группу восстанавливали до спиртовой гидрогенолизом в присутствии палладия на угле.

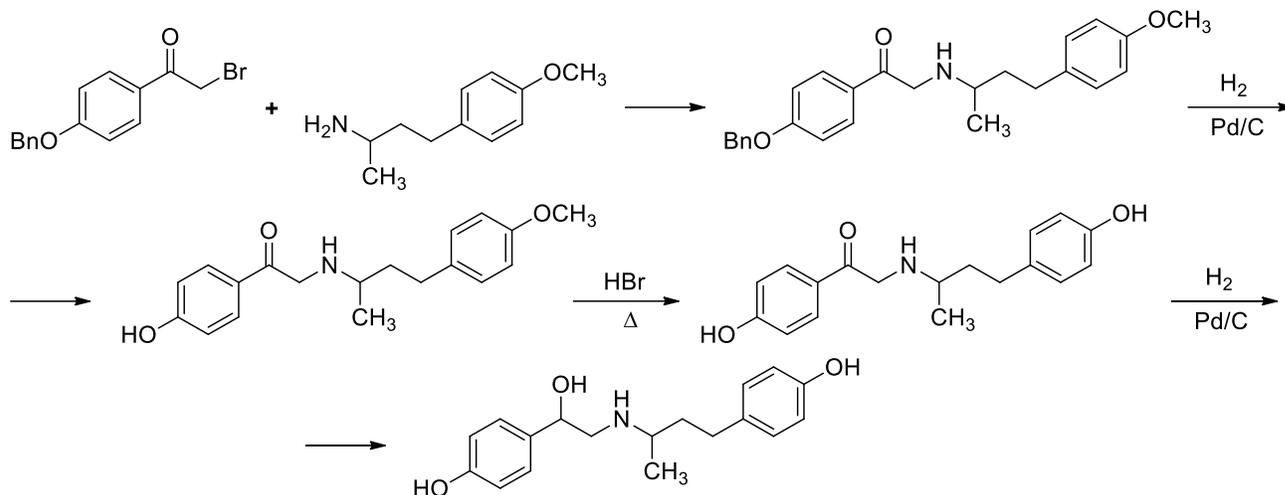


Рисунок 1.32 – Схема получения рактопамина по Ван Дижку (Способ 1)

По второму способу использовали метоксизамещенные исходные соединения: 4-(4-метоксифенил)бутан-2-амин алкилировали 4-метокси-2'-бромацетофеноном (рисунок 1.33). Далее, как и в предыдущем случае, проводили деметилирование кетона 48 %-ной бромоводородной кислотой при кипячении, а затем кето-группу восстанавливали до спиртовой в результате гидрогенолиза в присутствии палладия на угле.

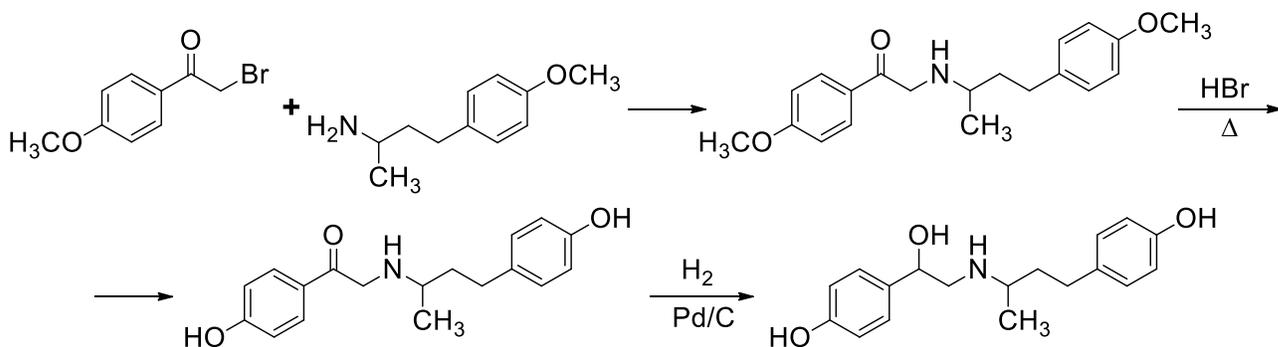


Рисунок 1.33 – Схема получения рактопамина по Ван Дижку (Способ 2)

Третий способ разработан авторами для разделения стереоизомеров. На первой стадии проводили алкилирование 4-(4-бензилоксифенил)бутан-2-амина 4-бензилокси-2'-бромацетофеноном с выходом продукта 29 % (рисунок 1.34). Затем из синтезированного кетона получали аминоспирт действием борогидрида натрия с общим выходом стереоизомеров 96 %. На этом этапе проводили разделение стереоизомеров перекристаллизацией и дальнейшей очисткой фильтрата. На заключительной стадии было проведено снятие бензильных групп гидрогенолизом в присутствии палладия на угле с

выходом продукта 10 %. Суммарный выход получения рактопамина по данной схеме составил 3 %.

Если разделение стереоизомеров не требуется, то схема синтеза рактопамина преобразуется в двухстадийную: после получения 1-(4-бензилоксифенил)-2-(3-[4-бензилоксифенил]-1-метилпропиламино)этанона проводили одновременное дебензилирование и перевод кето-группы в спиртовую под действием водорода в присутствии палладия на угле.

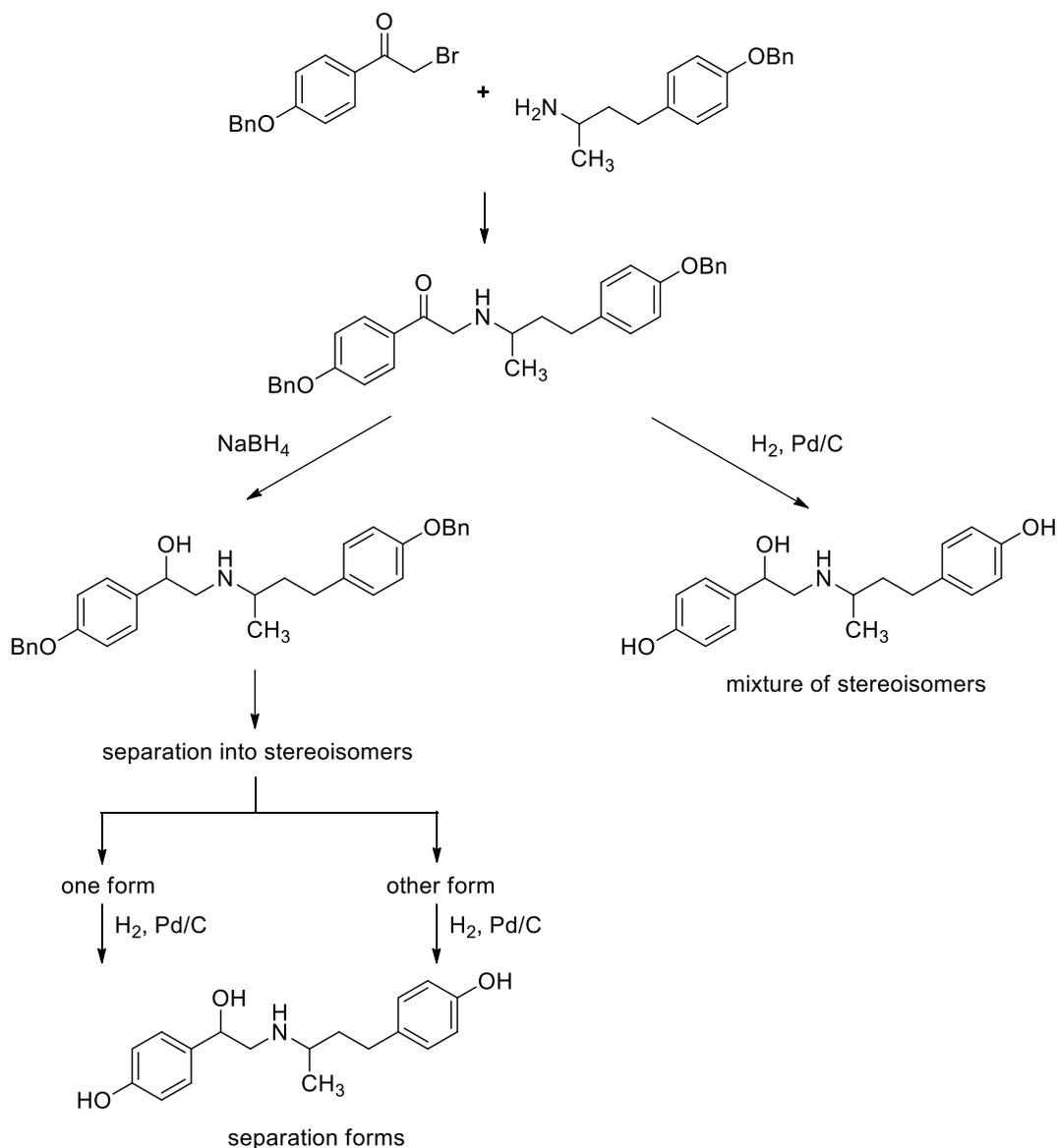


Рисунок 1.34 – Схема получения рактопамина по Ван Дижку (Способ 3)

Для первого и второго способов в статье не указаны выходы продуктов ни на одной стадии. Поскольку авторы получают не только рактопамин, но и его структурные аналоги,

в статье приведены общие условия проведения реакций: в большинстве случаев на стадии реакции алкилирования использовали триэтиламин для связывания бромоводорода; полученные в результате дебензелирования продукты либо не выделялись из реакционной массы, либо не требовали очистки; каталитическое гидрирование кетонов с получением аминспиртов протекало с количественным выходом.

В патентах [53, 54] описан способ получения рактопамина, подобный третьему способу без разделения стереоизомеров. Вместо бензилированных амина и бромацетофенона были использованы гидроксипроизводные. В источнике [55] для синтеза рактопамина в качестве исходных использованы 4-(4-гидроксифенил)бутан-2-амин и 4-бензилокси-2'-бромацетофенон.

В патенте [56] предложен способ получения рактопамина, ключевой стадией которого является взаимодействие 4-(4-гидроксифенил)бутан-2-амина с 2,2-дигидрокси-1-(гидроксифенил)этанонном (рисунок 1.35). В ходе реакции был получен имин, который затем восстанавливали борогидридом тетрабутиламмония до рактопамина. Необходимый для данных превращений дигидроксиэтанон был получен из 4-гидроксиацетофенона хлорированием с последующим гидролизом дихлорпроизводного раствором карбоната натрия.

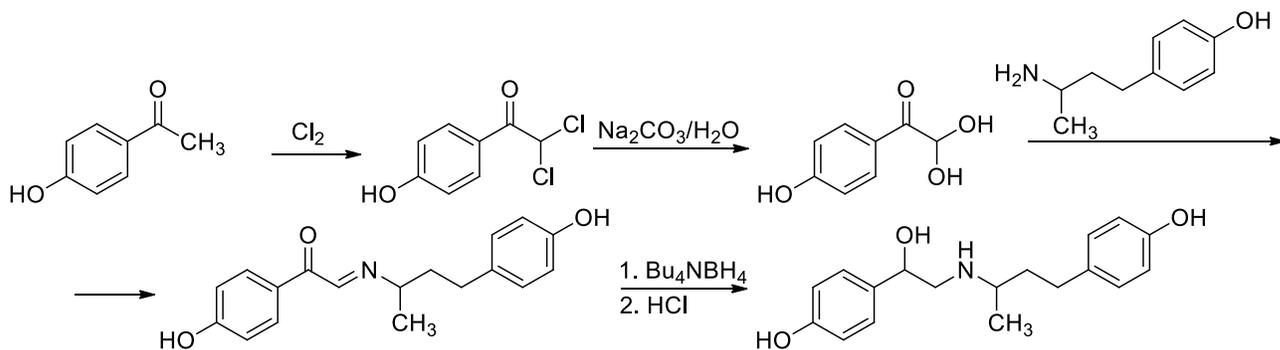


Рисунок 1.35 – Схема получения рактопамина по Янгу

1.2.9 Синтез добутамина

Добутамин по химической структуре наиболее близок к дофамину. Является избирательным стимулятором β_1 -адренорецепторов миокарда и оказывает сильное

инотропное действие (способствует усилению сократительной способности сердечной мышцы). Действует непосредственно на рецепторы и отличается этим от дофамина, оказывающего не прямое действие путем вытеснения норадреналина из гранулярных депо. В наибольшей степени стимулирует β_1 -адренорецепторы миокарда, β_2 -адренорецепторы сосудов и оказывает незначительное стимулирующее действие на α_1 -адренорецепторы. В многочисленных исследованиях было показано, что добутамин увеличивает ударный объем и сердечный выброс, но незначительно влияет на ЧСС. Такой эффект объясняется не только селективным влиянием на β_1 -адренорецепторы миокарда, но и на α_1 -адренорецепторы, стимуляция которых приводит к усилению силы сокращений без значимого повышения ЧСС. Добутамин применяют для инотропной терапии при сердечной недостаточности, сопровождающейся низким сердечным выбросом на фоне инфаркта миокарда, при операциях на открытом сердце, кардиомиопатии, септическом шоке, кардиогенном шоке [1, 57-59].

Впервые синтез добутамина описан в 1972 году в немецком патенте [60]. Целевой продукт был получен в две стадии (рисунок 1.36). На первой стадии осуществляли восстановительное аминирование 4-(4-метоксифенил)-бутан-2-она, который в дальнейшем был использован *in situ*. Затем проводили деметилирование полученного продукта 48 %-ой бромоводородной кислотой. Выходы продуктов не указаны.

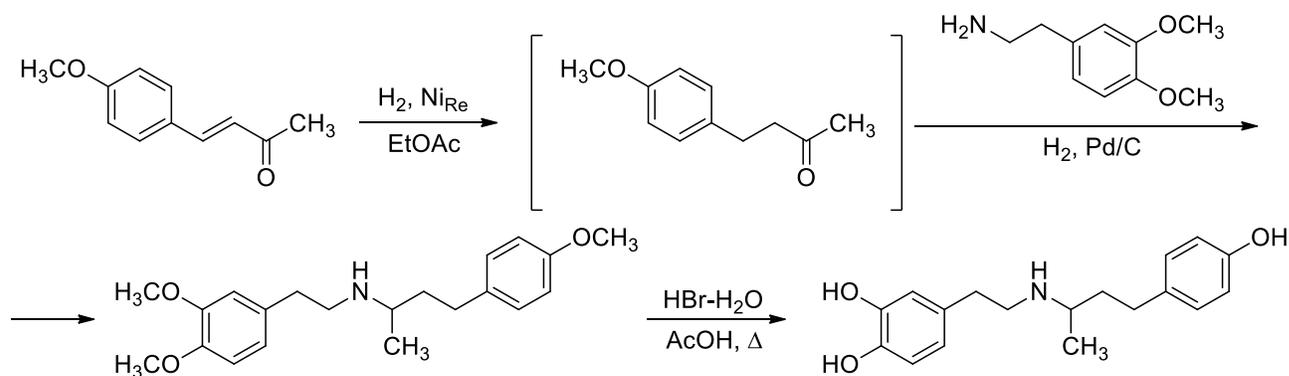


Рисунок 1.36 – Схема получения добутамина по Татле

Этими же учеными добутамин был синтезирован в 1975 году путем модификации изопротеренола [61].

Трехстадийный метод синтеза добутамина представлен в американском патенте [62]. На первой стадии был синтезирован амид 3,4-диметоксифенилуксусной кислоты с выходом

79 % (рисунок 1.37). Первоначально был получен ее хлорангидрид под действием тионилхлорида, который без дополнительного выделения был использован в процессе ацилирования. На второй стадии проводили восстановление полученного амида до соответствующего амина борогидридом натрия с выходом продукта 64 %. На заключительной стадии проводили деметилирование 48 %-ной бромоводородной кислотой. Полученный добутамин был переведен в форму гидрохлорида с выходом 63 %. Суммарный выход добутамина составил 32 %.

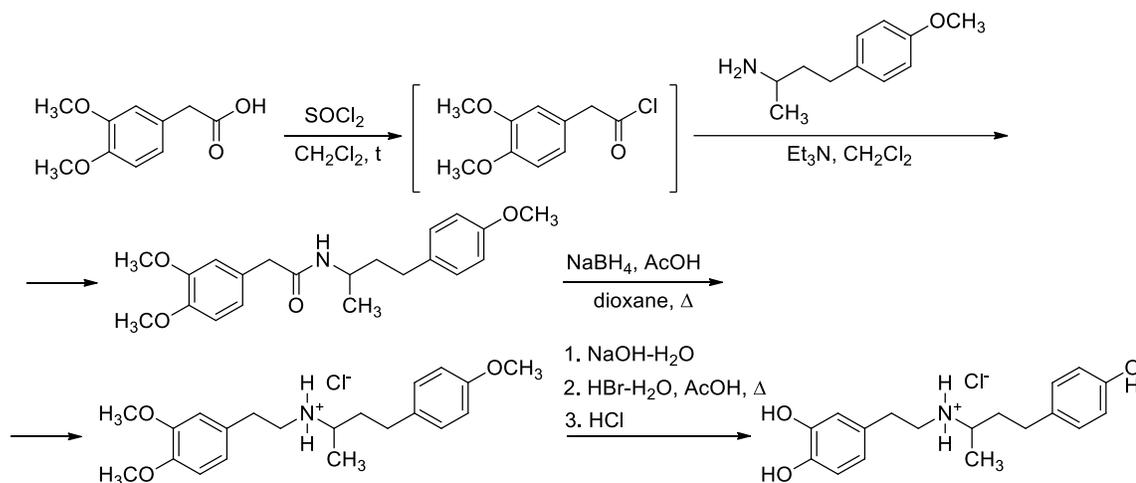


Рисунок 1.37 – Схема получения рактопамина по Хагишиту

Еще один способ синтеза добутамина представлен в патенте [63]. Авторы предложили более мягкие условия: синтезировать целевой продукт дебензилированием промежуточного вещества, полученного путем восстановительного аминирования 4-(4-бензилоксифенил)бутан-2-она 2-(3,4-дибензилоксифенил)этиламинам под действием 46 %-ного раствора триацетоксиборогидрида натрия, выход продукта составил 58 % (рисунок 1.38). Вторую стадию осуществляли под действием водорода в присутствии палладия на угле. Выход добутамина составил 81 %. Суммарный выход добутамина – 47 %.

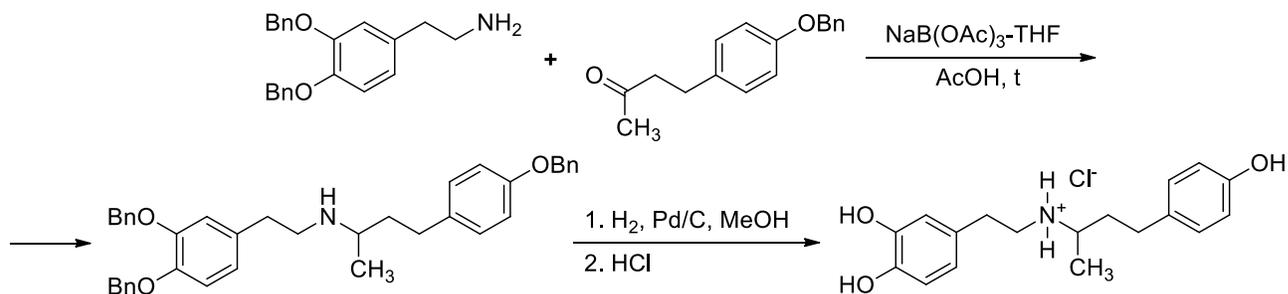


Рисунок 1.38 – Схема получения рактопамина по Фану

В этой же работе авторы предложили собственные способы деметилирования триметоксидобутамина, синтез которого описан в патентах [60, 62]. В качестве деметилирующих агентов были выбраны бромоводород в уксусной кислоте или безводный треххлористый алюминий в толуоле. В первом случае реакцию проводили при кипячении с выходом продукта 90 %. Во втором случае реакцию проводили при температуре 25-30°C, выход добутамина – 82 %.

В источнике [64] представлена схема синтеза добутамина, подобная описанной в патенте [63], однако вместо бензилированных амина и кетона были использованы метилированные соединения. Также аналогичный способ синтеза описан в патенте [65] – для защиты гидроксигрупп использовали диметикарбаматную группу.

1.2.10 Синтез ритодрина

По своей фармакологической активности ритодрин является β -симпатомиметиком с преобладанием β_2 -эффектов. Вызывает релаксацию бронхиол и кровеносных сосудов, усиливает гликогенолиз. Применяется в клинической медицине для предотвращения преждевременных родов. Ритодрин был единственным препаратом, одобренным Управлением по контролю за продуктами и лекарствами для токолитической терапии с 1979 года. Из-за перекрестной β_1 -активности у ритодрина присутствуют сердечнососудистые и метаболические побочные эффекты. Некоторые побочные эффекты выражены в виде материнской и эмбриональной тахикардии и материнской гипотензии [66, 67].

Как следует из данных литературного поиска, основным способом получения ритодрина является четырехстадийная схема синтеза (рисунок 1.39) [52, 68, 69]. В результате взаимодействия бензилокситирамина с бензилокси- α -бромпропиофеноном получают соответствующий α -аминопропиофенон, дальнейшее восстановление которого сначала борогидридом натрия, а затем гидрогенолизом продукта восстановления приводит к целевому ритодрину.

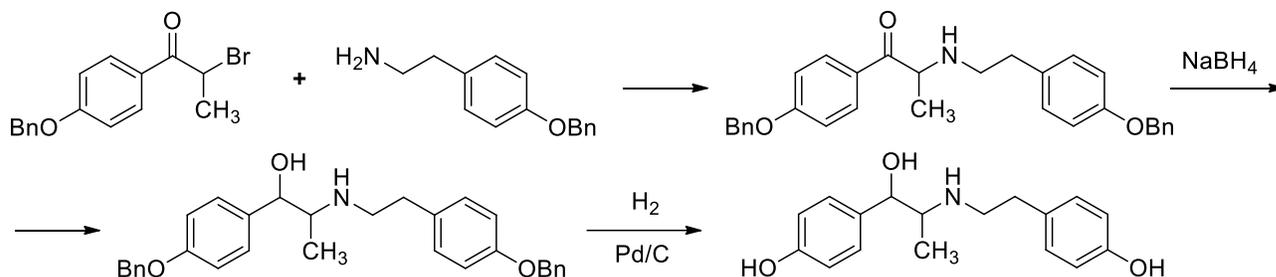


Рисунок 1.39 – Схема получения ритодрина

Подобные превращения описаны в китайском патенте [70], однако вместо бензильной защиты гидроксигрупп использована метильная.

Одностадийная схема получения гидрохлорида ритодрина предложена в источнике [71]. Целевое соединение получали в результате катализируемой реакции конденсации 4-(2-амино-1-гидроксипропил)фенола с 4-(2-галогенэтил)фенолом (рисунок 1.40). В качестве катализатора использовали йод, йодид калия или йодид меди. Выход продукта составил 83 %.

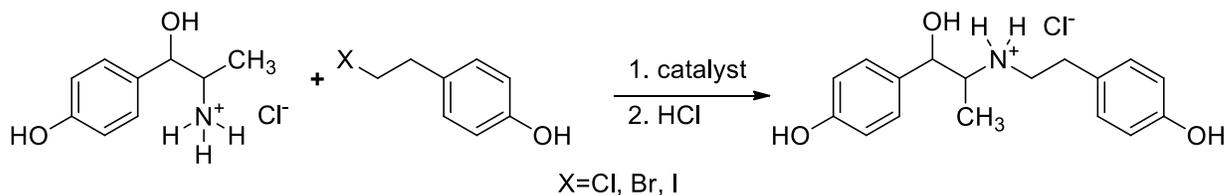


Рисунок 1.40 – Схема получения ритодрина по Ху (Способ 1)

Этим же автором предложен альтернативный двухстадийный способ синтеза ритодрина [72]. На первой стадии с выходом 91 % получали ацетамид в результате реакции ацилирования 2-амино-1-(4-гидроксифенил)пропанола 4-гидроксифенилацетилхлоридом, который затем восстанавливали действием водорода в присутствии палладия на угле до целевого соединения с выходом 82 % (рисунок 1.41).

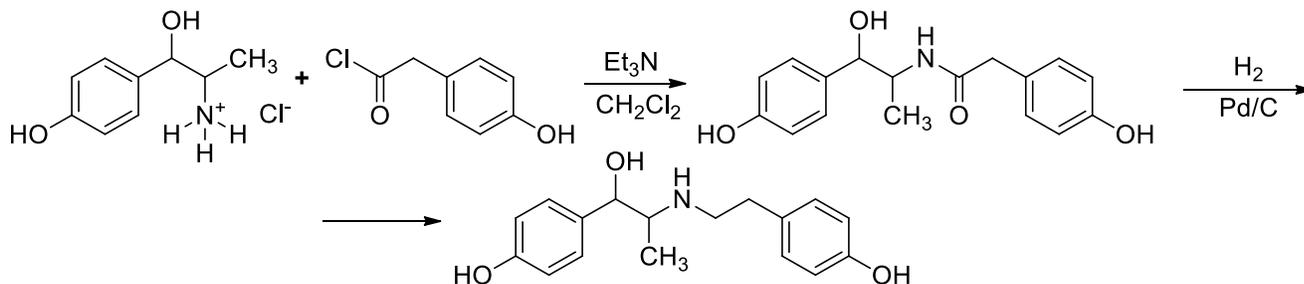


Рисунок 1.41 – Схема получения ритодрина по Ху (Способ 2)

Также этим же автором и группой китайских ученых предложен третий способ получения ритодрина [73]. Ритодрин был получен по одностадийной схеме в результате восстановительного аминирования 1-гидрокси-1-(4-гидроксифенил)пропан-2-она 2-(4-дибензилоксифенил)этиламиноом (рисунок 1.42). Выход продукта составил 85 %.

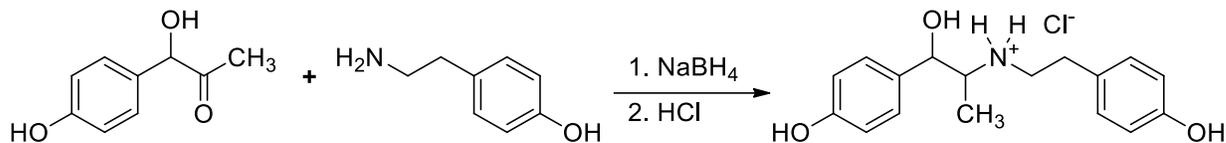


Рисунок 1.42 – Схема получения ритодрина по Ху (Способ 3)

1.2.11 Синтез прокатерола

Прокатерол является пероральным эффективным селективным β_2 -агонистом. Проявляет высокую бронходилаторную активность в микрограммовых дозах, оказывает быстрое и продолжительное действие и имеет высокую селективность по отношению к β_2 -адренорецепторам гладкой мускулатуры бронхов по сравнению с рецепторами сердечно-сосудистой мускулатуры [74, 75]. Широко применяется при лечении астмы у детей, снижая проницаемость микрососудов дыхательных путей, вызванную медиаторами воспаления, такими как эйкозаноиды, не влияя при этом на системное кровообращение [76].

Наиболее выполнимый способ синтеза прокатерола приведен в статье авторов из Японии [77] и более позднем китайском патенте [78]. На первой стадии авторы ацилировали 8-гидроксихинолин-2-он α -бромбутироилбромидом (рисунок 1.43). Затем полученное соединение вводили в реакцию N-алкилирования изопропиламина, выход продукта составил 55 %. Полученный кетон сразу вводили в реакцию восстановления борогидридом натрия, что позволило получить целевой прокатерол с выходом 73 %.

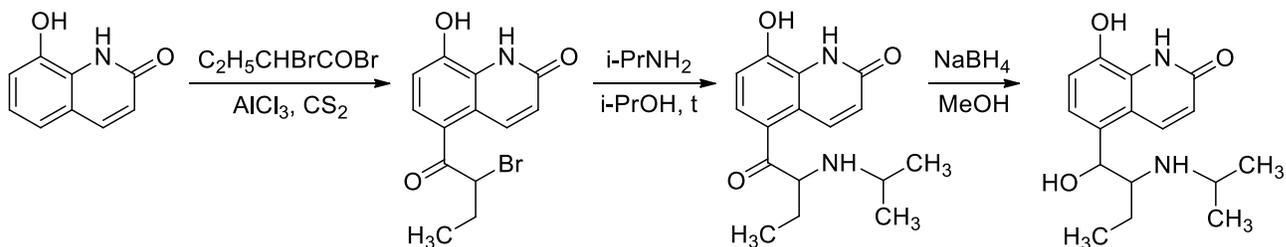


Рисунок 1.43 – Схема получения прокатерола по Йошизаки

При поиске оптимального метода получения прокатерола необходимо было синтезировать ключевое исходное соединение 8-гидроксихинолин-2-он. На основании литературных данных 8-гидроксихинолин-2-он может быть получен как методами внутримолекулярной конденсации, так и методами окисления 8-гидроксихинолина (рисунок 1.44).

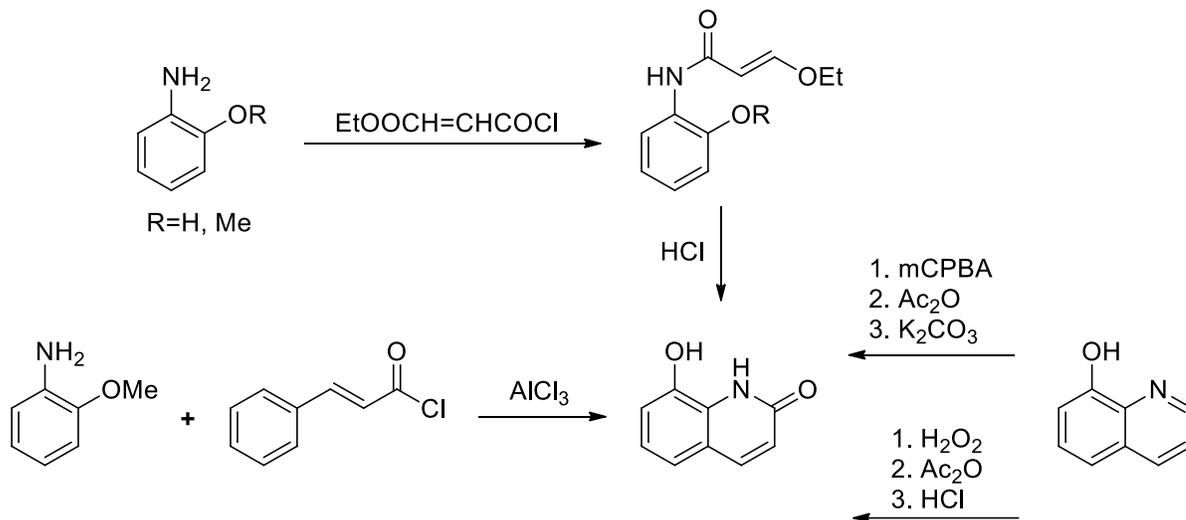


Рисунок 1.44 – Общие методы получения 8-гидроксихинолин-2-она

Впервые 8-гидроксихинолин-2-он был получен методом последовательного окисления 8-гидроксихинолина 30 %-ным водным раствором пероксида водорода, после нейтрализации избытка уксусной кислоты был выделен N-оксид-8-гидроксихинолина (рисунок 1.45) [79]. Затем его вводили в реакцию O-ацилирования уксусным ангидридом. Полученный продукт O-ацилирования и O-перегруппировки был подвержен кислотному гидролизу.

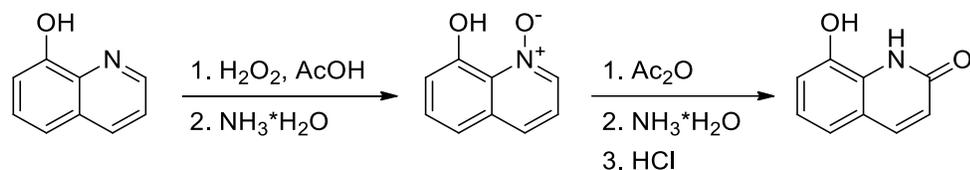


Рисунок 1.45 – Схема получения 8-гидроксихинолин-2-она по Флемингу

Начиная с 2005 года выходит ряд патентов, направленных на более дешевые промышленные методы N-окисления и перегруппировки N-оксида 8-гидроксихинолина в 8-гидроксихинолин-2-он, основанные на N¹-C²-перегруппировке атома кислорода N-оксида [80, 81]. Принципиальных отличий метода синтеза 8-гидроксихинолин-2-она, описанных в

1970 году [79], не наблюдается. В работах авторов из Китая было показано, что при нейтрализации избытка уксусной кислоты можно использовать как аммиак, так и поташ [82].

Исторически первый способ получения [79] 8-гидроксихинолин-2-она активно используется и в настоящее время. При этом окислительный агент может быть заменен на *мета*-хлорпербензойную кислоту [83].

В работе Эффенди было предложено проводить N-окисление в присутствии катализатора дигидрата вольфрамата натрия при температуре 75 °C [84].

В 1980-х годах был впервые предложен вариант получения 8-гидроксихинолин-2-она методом внутримолекулярной циклоконденсации (рисунок 1.46) [85]. Данный способ включает в себя последовательное N-ацилирование исходных анилинов и C-N-алкилирование по реакции Михаэля с последующим отщеплением молекулы этилового спирта или воды в присутствии кислотного катализатора.

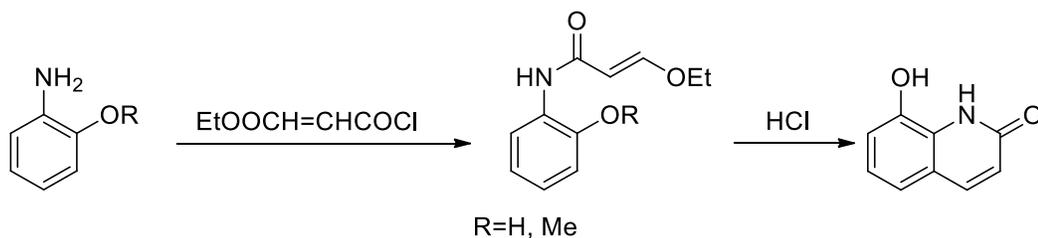


Рисунок 1.46 – Схема получения 8-гидроксихинолин-2-она по Йошизаки

Позже авторами из Канады было показано, что гидролиз 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-илацетата возможен не только в кислых условиях, но и в присутствии оснований, например, поташа в метаноле [86].

В 2018 году авторами из Китая был опубликован ряд патентов по получению 8-гидроксихинолин-2-она, основанных на внутримолекулярной циклоконденсации ацилированных аминофенолов или 2-аминофенилбороновых кислот и их эфиров хлорангидридами 3-арилакриловой кислоты (рисунок 1.47) [87, 88].

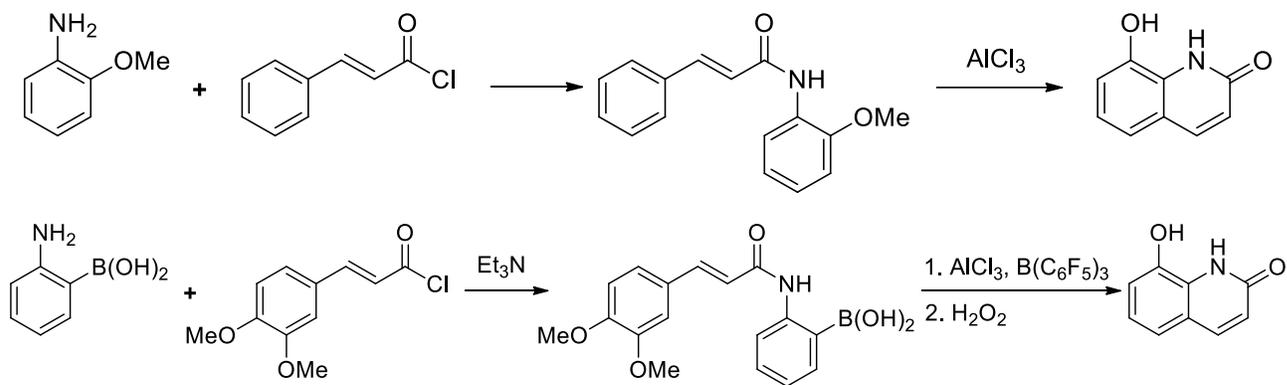


Рисунок 1.47 – Схема получения 8-гидроксихинолин-2-она по Вангу

Следующим этапом в синтезе прокатерола является ацилирование 8-гидроксихинолин-2-она по Фриделю-Крафтсу различными ацилирующими агентами. Если ацилирующий агент обладал подвижными атомами галогена в α -положении, то проводили дальнейшее алкилирование изопропиламина и его восстановление [89, 90, 91]. В случае если полученный кетон не содержал атомов галогена, то из него авторы из Испании [92, 93] первоначально отщепляли воду с получением алкена, превращали его в соответствующий эпоксид и им алкилировали изопропиламин с последующим восстановлением [94, 95]. Методы по получению данного рода производных 8-гидроксихинолин-2-она встречаются только в патентах авторов из Испании и Японии, опубликованных с 1975 по 1984 годы. В указанных патентах отсутствуют примеры, в точности, приводящие как к промежуточным веществам, так и к самому целевому соединению.

1.2.12 Синтез изоксуприна

Изоксуприн является одновременно агонистом β_1 - и β_2 -адренорецепторов. Данный препарат снижает тонус гладких мышц кровеносных сосудов, устраняет их спазм, что приводит к улучшению кровообращения и кровоснабжения тканей, тем самым позволяя применять его в качестве сосудорасширяющего препарата для лечения заболеваний периферических сосудов, сопровождающихся спазмом. Кроме того, изоксуприн снижает тонус гладких мышц матки, а также снижает частоту и амплитуду схваток. Однако в акушерской практике при угрозе преждевременных родов данный препарат применяется

редко в связи с тем, что эффективность ряда других препаратов при перечисленных состояниях выше [96]. Благодаря стимуляции β_2 -адренорецепторов изоксуприн имеет незначительную бронхолитическую активность, в больших дозах ингибирует агрегацию тромбоцитов. Широко используется в ветеринарии для лечения ладьевидного синдрома и ламинита у лошадей [97].

Впервые сведения о синтезе изоксуприна опубликованы в 1956 году в статье, посвященной получению новых вазодилаторов среди аналогов эpineфрина, содержащих липофильный фенооксипропиловый заместитель при атоме азота [98]. Исходным соединением для получения ключевых промежуточных соединений двух ветвей синтеза послужил фенол (рисунок 1.48). По первой схеме синтеза в результате ацилирования фенола пропионовой кислотой получили 4-гидроксипропиофенон с высоким выходом (90 %), который затем алкилировали бензилхлоридом с таким же выходом 90 % с целью защиты гидроксигрупп. В результате бромирования молекулярным бромом полученного пропиофенона было синтезировано первое ключевое соединение 4-бензилокси-2'-бромпропиофенон с выходом 75 %. По другой последовательности превращений фенол алкилировали хлорацетоном с образованием феноксиацетона, который затем конденсировали с аммиаком и полученный имин восстанавливали водородом на никеле Ренея с образованием второго ключевое промежуточного соединения 1-фенокси-2-пропанамина с выходом 60 %. В результате конденсации ключевых соединений при использовании избытка амина, выступающего как в роли реагента, так и в роли акцептора бромистого водорода, был получен 1-[4-(бензилокси)фенил]-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-он с выходом 90 %. В результате его гидрирования водородом в присутствии палладия на угле легко протекало удаление защитной группы – дебензилирование с образованием соответствующего кетона. Двухступенчатое гидрирование 0,16 М раствора ключевого аминокетона в 70%-ном этаноле, проводимое в присутствии катализатора 4,5 %-ного Pd/C взятого в соотношении 20 % от веса субстрата, протекало быстро только по первой ступени дебензилирования, благополучно завершено после добавочного введения хлорида палладия (II) до образования 6,25 %-ного Pd/C и добавочного гидрирования. В результате был получен продукт восстановления также и по

кетогруппе – гидрохлорид изоксуприна с выходом 30%. Суммарный выход изоксуприна составил 10 %.

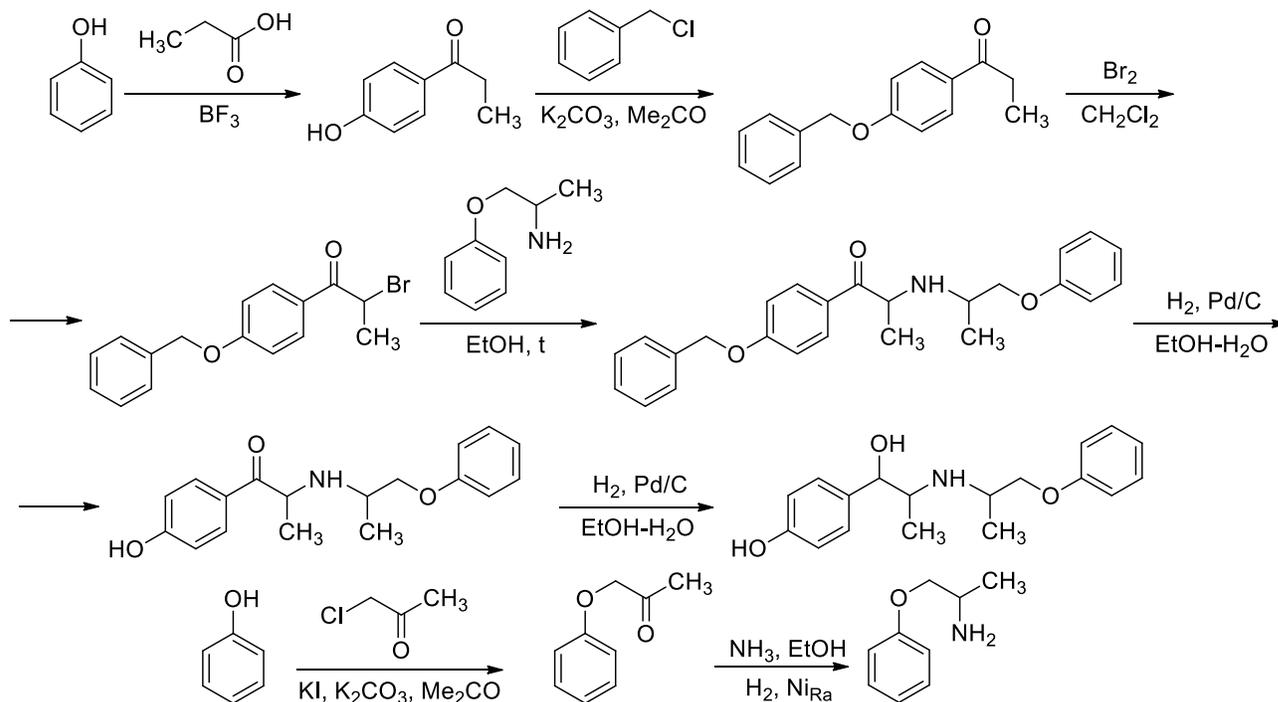


Рисунок 1.48 – Схема получения изоксуприна по Моеду и Ван Дижку

В последующей статье тех же авторов [99], посвященной получению стереоизомеров изоксуприна, были синтезированы четыре пары энантиомеров: *эритро*-, *аллоэритро*-, *трео*- и *аллотрео*-, как в виде свободных оснований, так и их солей.

Для получения стереоизомеров авторы использовали различные синтетические методы. В частности, для получения *эритро*-изомеров на заключительных стадиях использовали конденсацию вышеупомянутого бромпропиофенона с N-бензил-1-фенокси-2-пропанаминном (рисунок 1.49). Выход технического продукта аминпропиофенона составил 90 %. Последующее его гидрирование в присутствии 10 %-ного палладиевого катализатора сопровождалось как O- и N-дебензилированием, так и восстановлением кетогруппы до спиртовой, что позволило получить *эритро*-изомер с выходом 44 %.

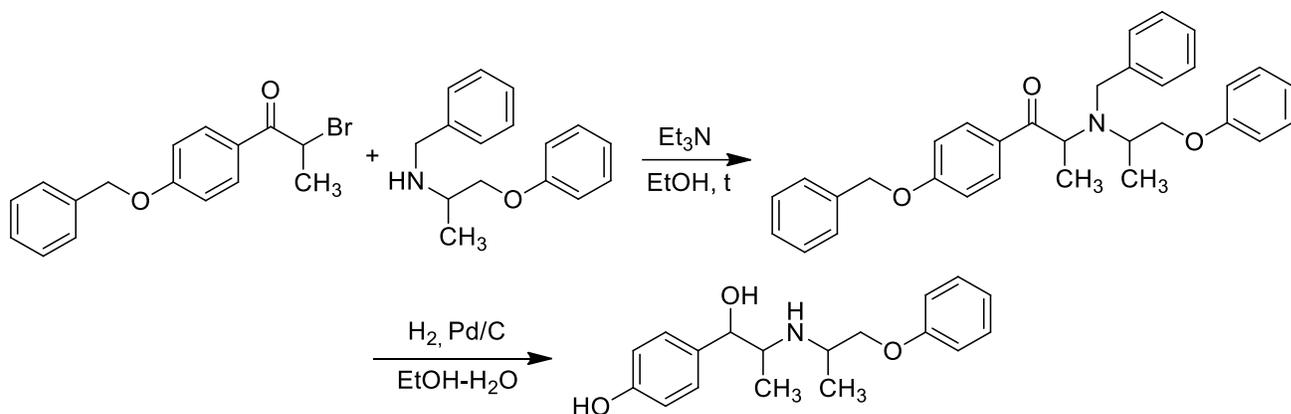


Рисунок 1.49 – Схема получения *эритро*-изомера изоксуприна по Моеду и Ван Дижку

Для получения *трео*-изомера авторы использовали другой метод восстановления того же ключевого аминокетона. Вначале в результате восстановления литийалюмогидридом был получен *трео*-изомер соответствующего аминспирта, который затем подвергли O- и N-дебензилированию водородом в присутствии палладия на угле, что привело к получению изоксуприна в форме *трео*-изомера (рисунок 1.50).

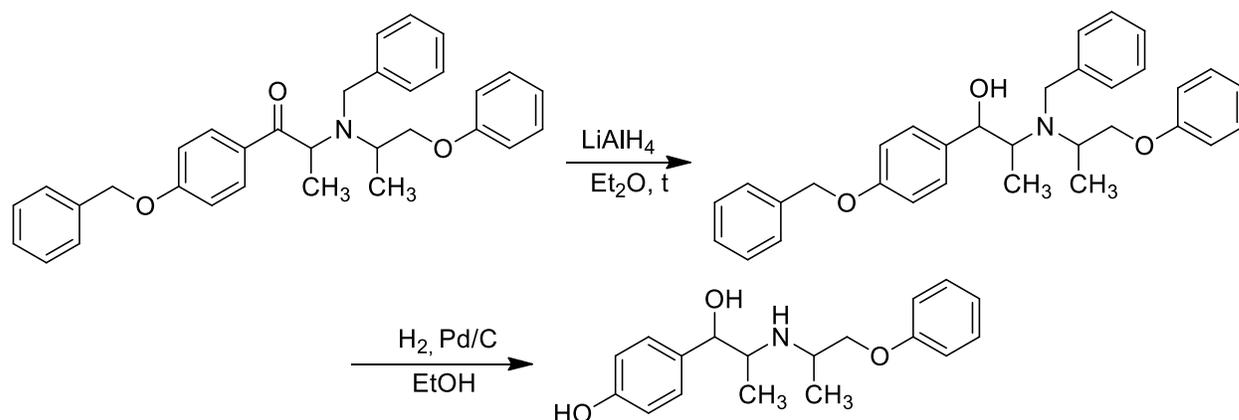


Рисунок 1.50 – Схема получения *трео*-изомера изоксуприна по Моеду и Ван Дижку

В более поздней статье индийских ученых, посвященной получению близких аналогов изоксуприна [100], ключевой промежуточный 4-бензилокси-2'-бромпропиофенон был получен по трехстадийной схеме при использовании других вспомогательных реагентов (рисунок 1.51). Вначале в результате перегруппировки Фриса фенилпропионата бы получен 4-гидроксипропиофенон, который алкилировали бензилхлоридом с образованием промежуточного 4-бензилоксипропиофенона. На заключительной стадии проводили его бромирование молекулярным бромом с получением ключевого 4-бензилокси-2'-бромпропиофенона.

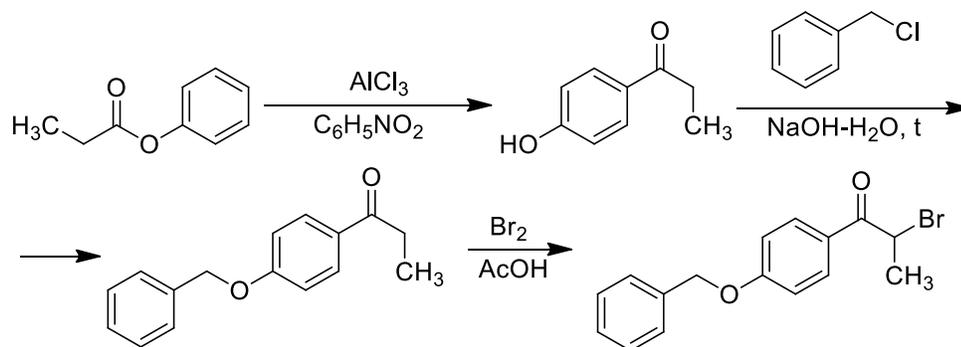


Рисунок 1.51 – Схема получения изоксуприна по Висванатану

1.2.13 Синтез хигенамина

Хигенамин (норкоклаурин) представляет собой алкалоид, выделенный в виде оптически инертной рацемической смеси из различных растений, в том числе из корней *Acontium carmichaelii* (борец Кармихеля), семян *Nelumbo nucifera* (лотос орехоносный), плодов *Annona squamosa* (аннона чешуйчатая), *Asarum heterotropoides* (копытень гетеротроповидный) и стеблей и лозы *Galium verum* (подмаренник дикий) [101]. Хигенамин, являющийся активным компонентом этих растений, давно и широко используется в восточной традиционной медицине Китая в составе препаратов с кардиотоническим, мочегонным, обезболивающим эффектом, а так же как средство от ревматоидного артрита и паралича [101-103].

Хигенамин также обладает антитромбоцитарной активностью и антитромбическим потенциалом [104]. Он является агонистом β_1 -адренорецепторов, увеличивая сердечный выброс, но при этом расширяет сосуды скелетных мышц, стимулируя β_2 -адренорецепторы, оказывает кардиоваскулярный эффект [105]. Хигенамин также усиливает липолиз и термогенез и поэтому считается эффективным агентом против ожирения [106].

В литературных источниках представлено несколько способов получения хигенамина. Многостадийный синтез оптически активных (*R*)-(+)- и (*S*)-(-)-хигенамина был предложен корейскими учеными (рисунок 1.52) [107]. Для синтеза (*R*)-(+)-хигенамина смесь коммерчески доступных 3,4-диметоксифенилэтиламина и 4-метоксифенилуксусной кислоты была нагрета до 200 °С. В ходе реакции конденсации был получен соответствующий амид с выходом 94 %. Далее амид циклизовали по реакции Бишлера-

Напиральского до нестабильного имида с выходом 98 %. Ключевой стадией синтеза стало каталитическое асимметричное восстановление имида, проводимое с использованием катализатора Нойори. Полученный продукт содержал ряд побочных продуктов, после дополнительной очистки его выход составил 62 %. Синтезированный амин оказался нестабильным, поэтому был переведен в форму гидробромида с выходом продукта 84 %. На заключительной стадии было проведено деметилирование при воздействии на гидробромид амина трибромидом брома. Выход оптически активного (*R*)-(+)-хигенамина составил 78 %. Суммарный выход (*R*)-(+)-хигенамина составил 37 %

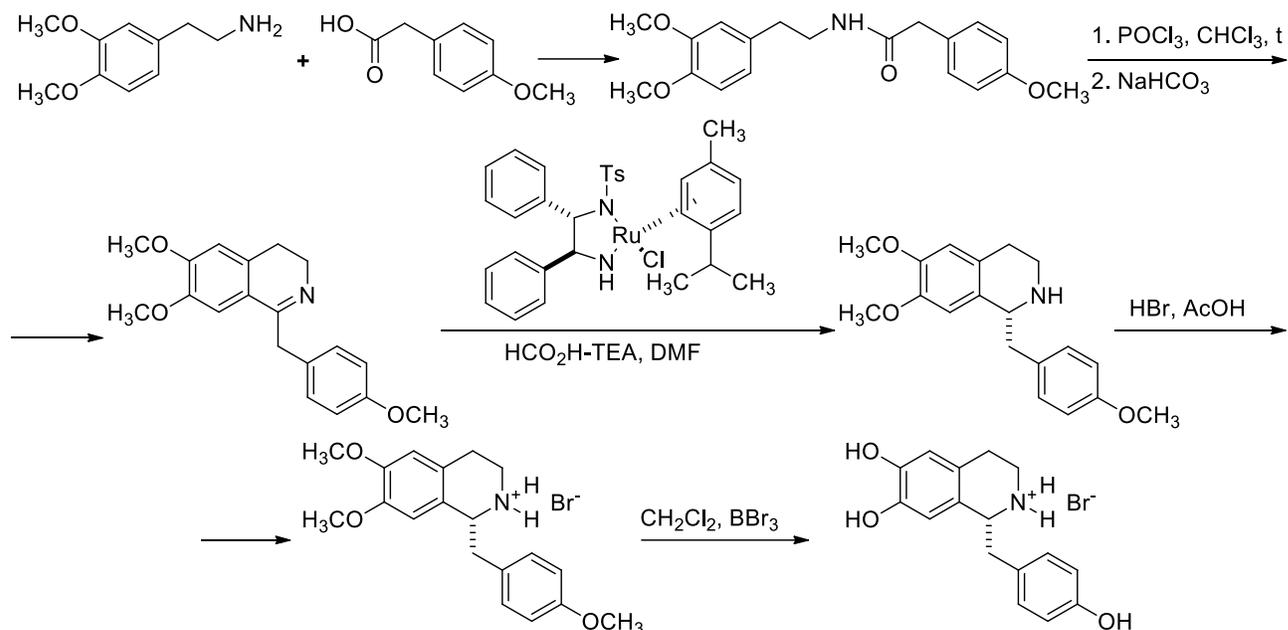


Рисунок 1.52 – Схема получения оптически активного хигенамина по Пио

Оптически активный (*S*)-(-)-хигенамин был получен по схеме аналогичной для (*R*)-(+)-хигенамина, за исключением применяемого катализатора на стадии восстановления имида: вместо (*S,S*)-катализатора Нойори был использован (*R,R*)-катализатор.

Самым распространенным способом получения хигенамина является взаимодействие дофамина с 4-гидроксифенилацetalальдегидом (рисунок 1.53).

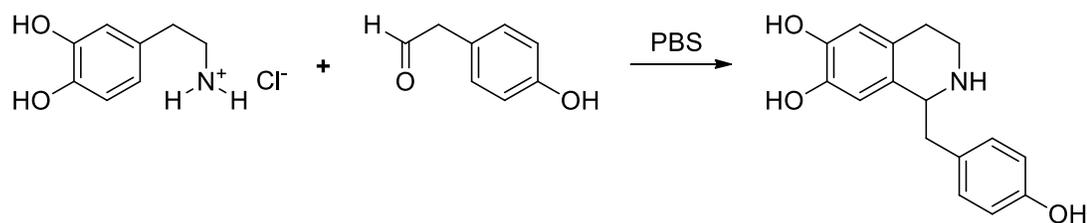


Рисунок 1.53 – Схема получения хигенамина по реакции Пикте-Шпенглера

Так в статье американских авторов [108] исследовано взаимодействие различных аминов и альдегидов по реакции Пикте-Шпенглера. Основной синтетической проблемой в этой реакции является низкая стабильность обоих субстратов: дофамин легко подвергается окислительной деградации, в то время как 4-гидроксифенилацетальдегид полимеризуется в щелочных и кислотных условиях. Было предположено, что проведение реакции в буферном растворе позволит получить продукт с хорошим выходом, при этом буферный раствор будет действовать как эффективный мягкий катализатор и являться ключевым компонентом в исследуемой реакции.

Синтез хигенамина был проведен в таких буферах, как HEPES, Tris, MOPS и различных фосфатных буферах. Результаты однозначно показали, что буферы, приготовленные из гидрофосфата калия или натрия и дигидрофосфата калия или натрия, способствовали увеличению выхода целевого продукта до 77 %.

Альтернативный способ синтеза хигенамина предложен в статье [109]. На первой стадии в ходе реакции окислительного декарбоксилирования тирамина с гипохлоритом натрия был получен 4-гидроксифенилацетальдегид с выходом 71 % (рисунок 1.54). Далее по реакции Пикте-Шпенглера альдегид вводили во взаимодействие с дофамином с получением хигенамина, выход которого составил 81 %.

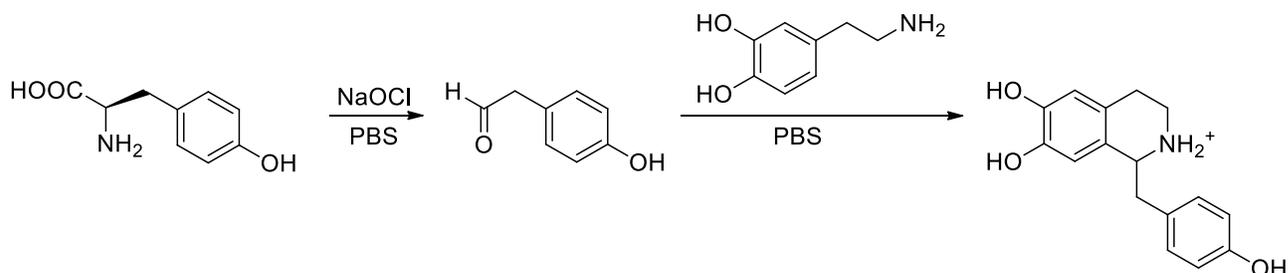


Рисунок 1.54 – Схема получения хигенамина по Марли

Авторами статьи также успешно проведена попытка осуществить данную схему синтеза хигенамина *one pot*. Этой же группой авторов был проведен ферментативный синтез (*S*)-хигенамина. Фермент Норкоклауринсинтаза (NCS) реагировал с дофамином и 4-гидроксифенилацетальдегидом, полученном в результате реакции окислительного декарбоксилирования тирозина, что позволило стереоселективно выделить (*S*)-хигенамин. Ранее в 2010 году был описан аналогичный способ получения (*S*)-хигенамина с использованием NCS методом *one pot* [110].

В китайских патентах [111, 112] предложен способ синтеза хигенамина с использованием в качестве исходных 2-(3,4-диметоксифенил)этиламина и 4-метоксифенилуксусной кислоты (рисунок 1.55). В результате реакции конденсации был получен дигидроизохиолин, который затем был восстановлен до тетрагидроизохиолина. На заключительном этапе снимали защитные метоксигруппы.

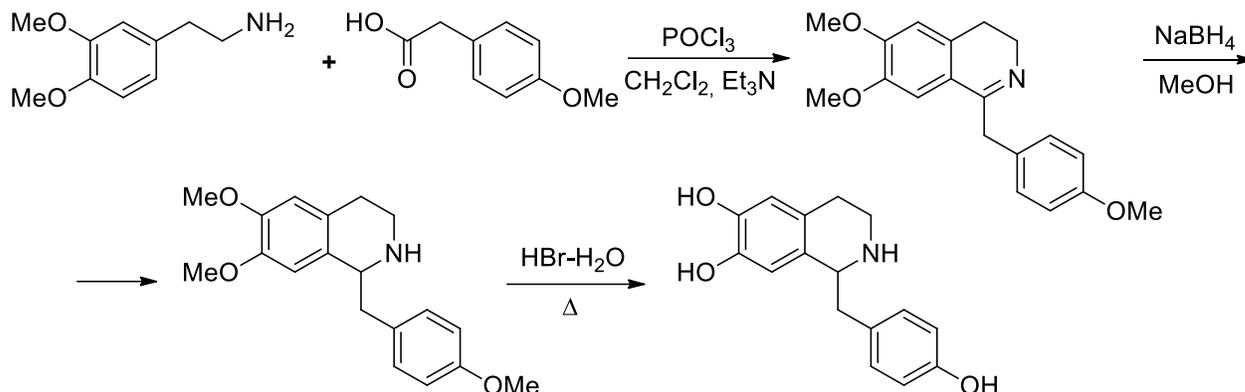


Рисунок 1.55 – Схема получения хигенамина по Жао

1.3 Синтез 2-амино-2-арилэтанолов, проявляющих β₂-агонистическую активность

В 2004 году китайскими учеными было показано, что соединения ряда 2-амино-2-арилэтанолов с гидроксигруппой в α-положении и аминогруппой в β-положении обладают значительной β₂-агонистической активностью [113]. В выпущенном патенте и более поздней статье этих же ученых [114] предложен способ синтеза новых производных 2-амино-2-арилэтанолов. Согласно разработанной схеме целевые соединения получали в результате восстановления замещенных бромацетофенонов с последующим алкилированием бромгидринами соответствующих аминов (рисунок 1.56). Реакцию восстановления кето-группы бромацетофенонов до спиртовой осуществляли с использованием борогидрида натрия в среде этанола при комнатной температуре. Взаимодействие бромгидринов с алкиламинами проводили в безводных условиях, используя в качестве растворителей спирты (безводный этанол) или ароматические углеводороды (толуол), при температуре кипения растворителя. Выход целевых

соединений составил 7–39 %. Необходимые для данных превращений бромацетофеноны были получены из 4-аминоацетофенона по методике [115].

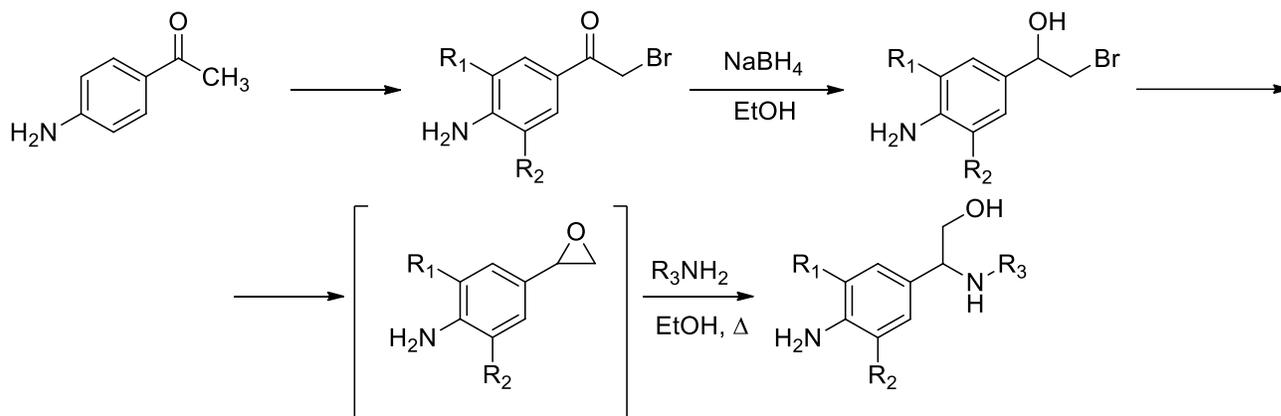


Рисунок 1.56 – Схема получения 2-амино-2-арилэтанолов

Объяснение подобного превращения через образование из бромгидрина оксирана и его последующего раскрытия в безводных растворителях против правила Красусского с образованием 2-алкиламино-2-арилэтанолов были даны испанскими учеными при попытке получения ^{13}C -меченного кленбутерола [116].

В качестве представителей 2-амино-2-арилэтанолов нами для синтеза были выбраны изомерные аналоги кленпроперола, кленпентерола, мабутерола, мапентерола и циматерола. В свою очередь, изомер мабутерола, получивший название трантинтерол, а также известный как SPFF, в настоящее время проходит клинические испытания, проводимые в Китае, в качестве препарата для симптоматического лечения астмы. В результате доклинических исследований было показано, что данное соединение является эффективным и селективным агонистом β_2 -адренорецепторов с длительным периодом действия и низким кардиотоническим эффектом. В патенте [113] предложена схема синтеза трантинтерола. Замещенную бензойную кислоту обрабатывали тионилхлоридом с образованием 4-амино-3-хлор-5-трифторметилбензоилхлорида с выходом 80–90 %. Далее бензоилхлорид вводили во взаимодействие с диэтиловым эфиром малоновой кислоты с получением ацетофенона (выход продукта – 75–85 %), который затем бромировали молекулярным бромом с выходом 50–60 % (рисунок 1.57). На следующей стадии с выходом 85–95 % был получен оксиран, раскрытие которого *трет*-бутиламином в

абсолютном спирте привело к образованию трантинтерола. Выход конечного продукта составил 20–30 %.

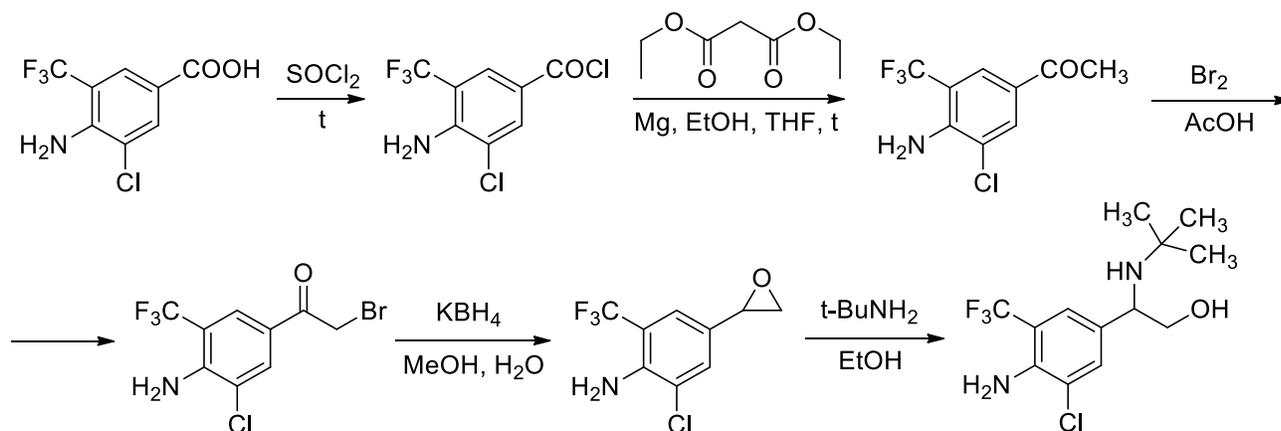


Рисунок 1.57 – Схема получения трантинтерола по Ченгу

Синтез изомерного аналога циматерола – 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-изопропиламиноэтанола также представлен в патенте [113]. Согласно предложенной схеме на первой стадии йодировали 4-аминоацетофенон с образованием 3-йодпроизводного с выходом 60–90 % (рисунок 1.58). Затем в полученном соединении действием цианида меди атом йода замещали на цианогруппу с выходом продукта 57 %. На следующей стадии получали бромацетофенон с выходом 95 % с использованием в качестве бромлирующего агента бромиды меди. Далее, аналогично предыдущей схеме, восстановление кето-группы бромгидрина и последующее раскрытие оксирана изопропиламином привело к целевому соединению.

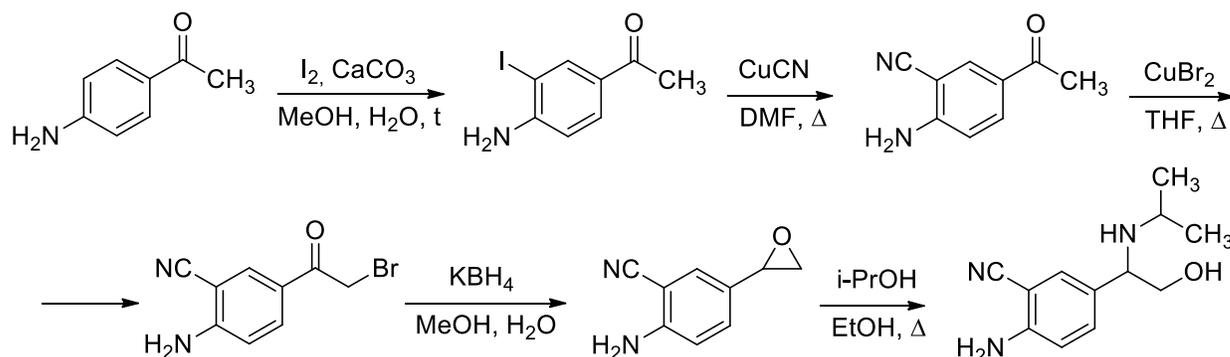


Рисунок 1.58 – Схема получения изомерного аналога циматерола по Ченгу

В статье [114] описаны условия реакции синтеза изомерного аналога кленпроперола – 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-изопропиламиноэтанола из бромгидрина, выход продукта составил 7,5 % (рисунок 1.59).

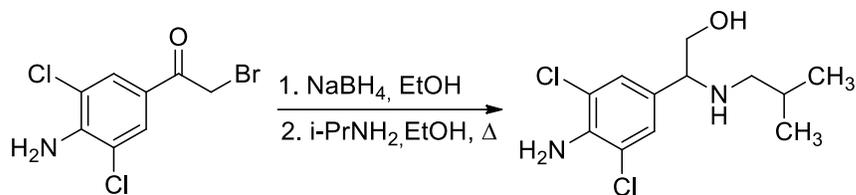


Рисунок 1.59 – Схема получения изомерного аналога кленпропера по Ге

1.4 Фармакокинетика и метаболизм β -агонистов

Исследования абсорбции и выведения β -адренергических агонистов показали, что пиковые уровни данных соединений в плазме наблюдаются в течение 1-3 ч после перорального введения препаратов людям и сельскохозяйственным животным. Известно, что биодоступность кленбутерола составляет 70–80 %. За счет липофильной природы данное соединение быстро распределяется по всему организму, включая ЦНС [10]. Кленбутерол также преодолевает гематоэнцефалический барьер и проникает через плаценту. При этом период полувыведения кленбутерола составляет 25-39 ч, поскольку галоген-атомы в его структуре препятствуют быстрой метаболической деактивации. Один из путей вывода неметаболизированного кленбутерола – моча. При этом соотношении неизменного кленбутерола по отношению к метаболитам, выводимым с мочой, составляет 61 % для людей, 37 % для кроликов, 26 % для мышей и 24 % для собак и сильно зависит от способа введения препарата.

Механизм биотрансформации β -агонистов неоднозначен [9]. Не все соединения данной группы преобразуются одинаково. Наличие в структуре ароматического кольца определяет направление метаболизма и существенно влияет на неизменность β -агонистов в тканях млекопитающих и их эффективность по отношению к рецептору.

Комбинация заместителей в ароматическом кольце является определяющим фактором для путей метаболизма β -агонистов (таблица 2). Например, катехолы быстро деактивируются метилированием 3-гидрокси группы в ароматическом кольце под действием катехоламин-О-метилтрансферазы (КОМТ), значительно ограничивая их эффективность после перорального применения. Препараты с другой комбинацией гидроксильных групп в ароматическом кольце, которые были разработаны для сохранения

активности по отношению к рецептору, устойчивы к деактивации КОМТ. Резорцинолы, салигенины и простые фенолы не являются субстратами для КОМТ. Они также не подвержены окислительному метаболизму в любом виде. Однако, β -агонисты данных групп быстро деактивируются ферментами в печени и в кишечнике. У лабораторных животных, в животноводстве и у людей пути биотрансформации этих гидроксированных соединений проходят исключительно через глюкуронидацию и сульфатирование.

Таблица 2 – Пути биотрансформации β -агонистов [9]

Группы β -агонистов	Пути биотрансформации		
	КОМТ	Сопряжение*	Окисление
Фенолы	-	+	-
Резорцинолы	-	+	-
Катехолы	+	+	+
Салигенины	-	+	-
Галогенанилины	-	+	+

* – глюкуронидация и / или сульфатирование.

Присутствие заместителей в ароматическом кольце, которые подвергаются биотрансформации ферментами, приводит к быстрой биодegradации. Вместо гидроксильных групп в качестве заместителей используют атомы галогенов, которые не ингибируют связывание с рецептором, но препятствуют их быстрой метаболической деактивации, что происходит с гидроксированными β -агонистами. Кроме того, атом галогенов увеличивают липофильность ароматического фрагмента.

Поскольку β -агонисты существуют как рацематы стереоизомеров, они восприимчивы к стереоспецифической и стереоселективной биотрансформации. Например, стереоспецифический метаболизм характерен для глюкуронидации только *RR*- и *RS*-стереоизомеров рактопамина по гидроксигруппе β -фенильного кольца.

В целом, метаболизм любого β -агониста схож для всех рассмотренных видов, а основные различия носят скорее количественный, а не качественный характер. Далее будут рассмотрены основные пути биотрансформации кленбутерола, бромбутерола и вилантерола, для которых разработаны методы синтеза некоторых метаболитов.

1.4.1 Метаболизм кленбутерола

Первоначально процесс комплексной биотрансформации кленбутерола изучался на крысах, кроликах и собаках [117]. В моче собак были идентифицированы пять метаболитов, а в моче крыс и кроликов восемь.

Залко и соавторы провели исследование метаболизма ^{14}C -кленбутерола на мужских и женских особях крыс линии Вистар [118]. После единичной пероральной дозы 200 мг/кг ^{14}C -кленбутерола на восьмой день изучаемого периода около 60 % изотоп-содержащего препарата было выделено с мочой, 20 % и 30 % - с калом самцов и самок, соответственно. Методом ВЭЖХ-МС удалось определить тринадцать различных метаболитов в моче самцов и одиннадцать в моче самок. Предполагаемые пути метаболизма показаны на рисунке 1.60 [10, 117].

Важный путь метаболизма кленбутерола заключается в окислительном расщеплении боковой цепи молекулы с образованием 4-амино-3,5-дихлорминдальной кислоты (**МК5**) и ее дальнейшей биотрансформацией (через **МК6**), приводящей к образованию 4-амино-3,5-дихлорбензойной кислоты (**МК7**). Кроме того, при взаимодействии метаболита **МК7** с глицином образуется такой метаболит как 4-амино-3,5-дихлоргиппуровая кислота (**МК14**). Эти метаболиты являются основными компонентами у лабораторных животных, крупного рогатого скота и людей.

Найдено, что одним из возможных путей метаболизма кленбутерола является N-окисление в соответствующий гидросиламин и 3,5-дихлор-4-нитро- α -(*трет*-бутиламинометил)бензиловый спирт (**МК2**), который позже был выделен в небольших количествах. Путем химического автоокисления 4-гидроксиамино-3,5-дихлор- α -(*трет*-бутиламинометил)бензилового спирта (**МК1**) в образцах мочи после хранения появляется 3,5-дихлор-4-нитрозо- α -(*трет*-бутиламинометил)бензиловый спирт (**МК3**). При этом наблюдались негендерносвязанные различия, четко проявившиеся при использовании пероральных доз с высоким содержанием кленбутерола.

Наблюдалось окисление *трет*-бутильной группы с образованием 4-амино-3,5-дихлор- α -(2-гидрокси-1,1-диметилэтиламинометил)бензилового спирта (**МК12**) с дальнейшим окислением его до соответствующей карбоновой кислоты (**МК13**).

Также сообщалось о путях сопряжения исходного кленбутерола глюкуронидацией β -гидроксильной группы (**МК9**) и алифатического азота (**МК10**), сульфатированием ароматического амина (**МК4**) и иногда этилирование бензилового спирта (**МК11**). Последнее, скорее всего, характерно только для кленбутерола.

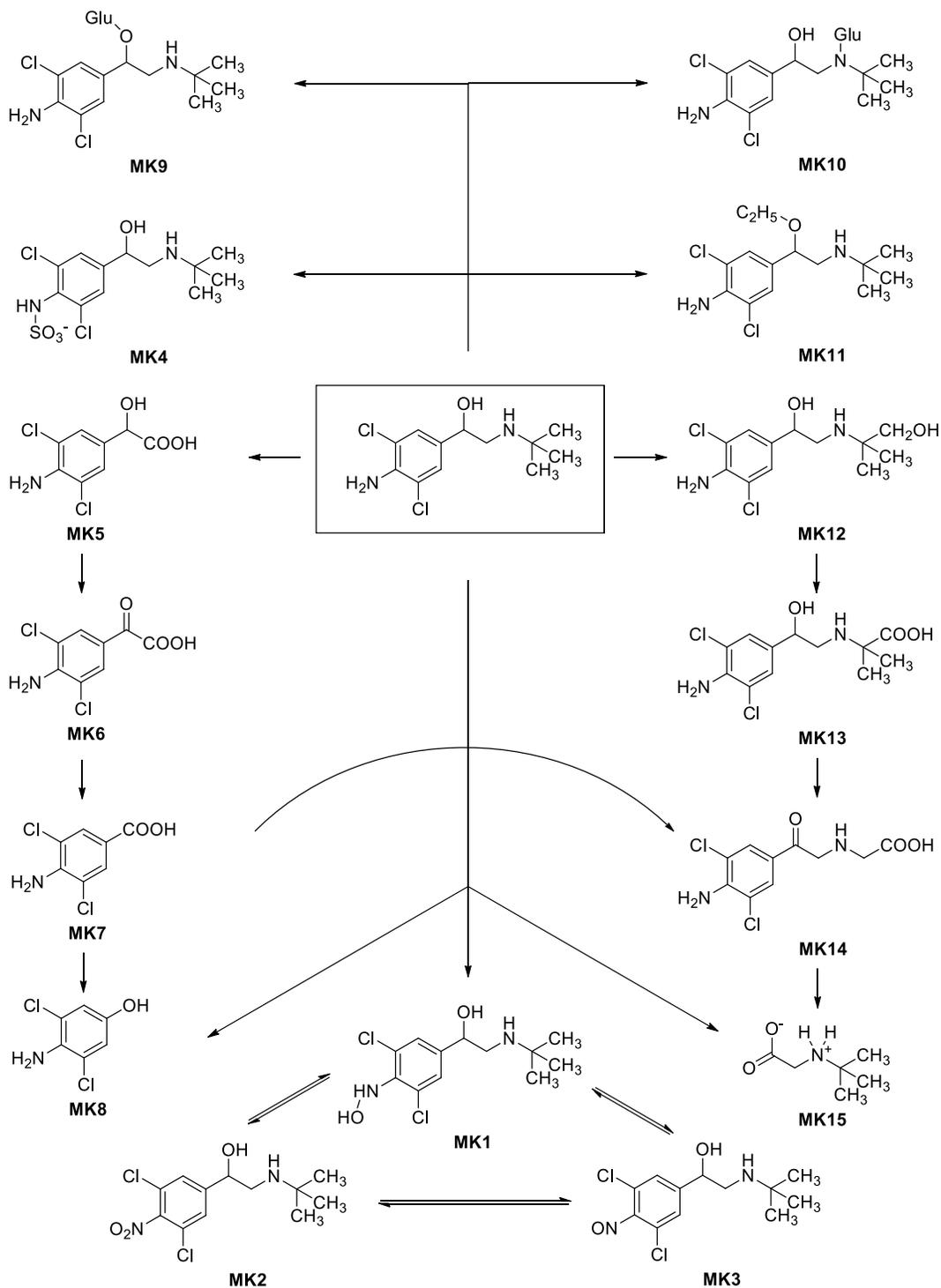


Рисунок 1.60 – Пути биотрансформации кленбутерола

1.4.2 Метаболизм бромбутерола

Метаболизм бромбутерола был изучен на микросомах печени свиньи [119]. Анализ полученных метаболитов методом ВЭЖХ-МС позволил определить три основных направления биотрансформации бромбутерола (рисунок 1.61).

Во-первых, бромбутерол под воздействием флавиномоноксигеназ преобразуется N-окислением в соответствующий гидроксилламин и 3,5-дибром-4-нитро- α -(*трет*-бутиламинометил)бензиловый спирт (**МБ1**), который показал свою нестабильность. Вследствие химической неустойчивости и спонтанного окисления 4-гидроксиамино-3,5-дибром- α -(*трет*-бутиламинометил)бензилового спирта (**МБ2**) во время анализа вызвало появление в образцах 3,5-дибром-4-нитрозо- α -(*трет*-бутиламинометил)бензилового спирта (**МБ3**).

Во-вторых, как и все галогенанилины, бромбутерол подвержен окислительному расщеплению боковой цепи молекулы с образованием 4-амино-3,5-дибромминдальной кислоты (**МБ5**), которая в дальнейшем через 2-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2-оксоуксусную кислоту (**МБ6**) преобразуется в 4-амино-3,5-дибромбензойную кислоту (**МБ7**). Кроме того, при взаимодействии **МБ7** с глицином образуется такой метаболит как 4-амино-3,5-дибромгиппуровая кислота (**МБ8**).

В-третьих, имеет место окисление изобутильной группы бромбутерола, в результате которого образуется 4-амино-3,5-дибром- α -(2-гидрокси-1-метил)этиламинометилбензиловый спирт (**МБ4**).

Кроме того, бромбутерол подвергается глюкуронидации по β -гидроксильной группе (**МБ9**).

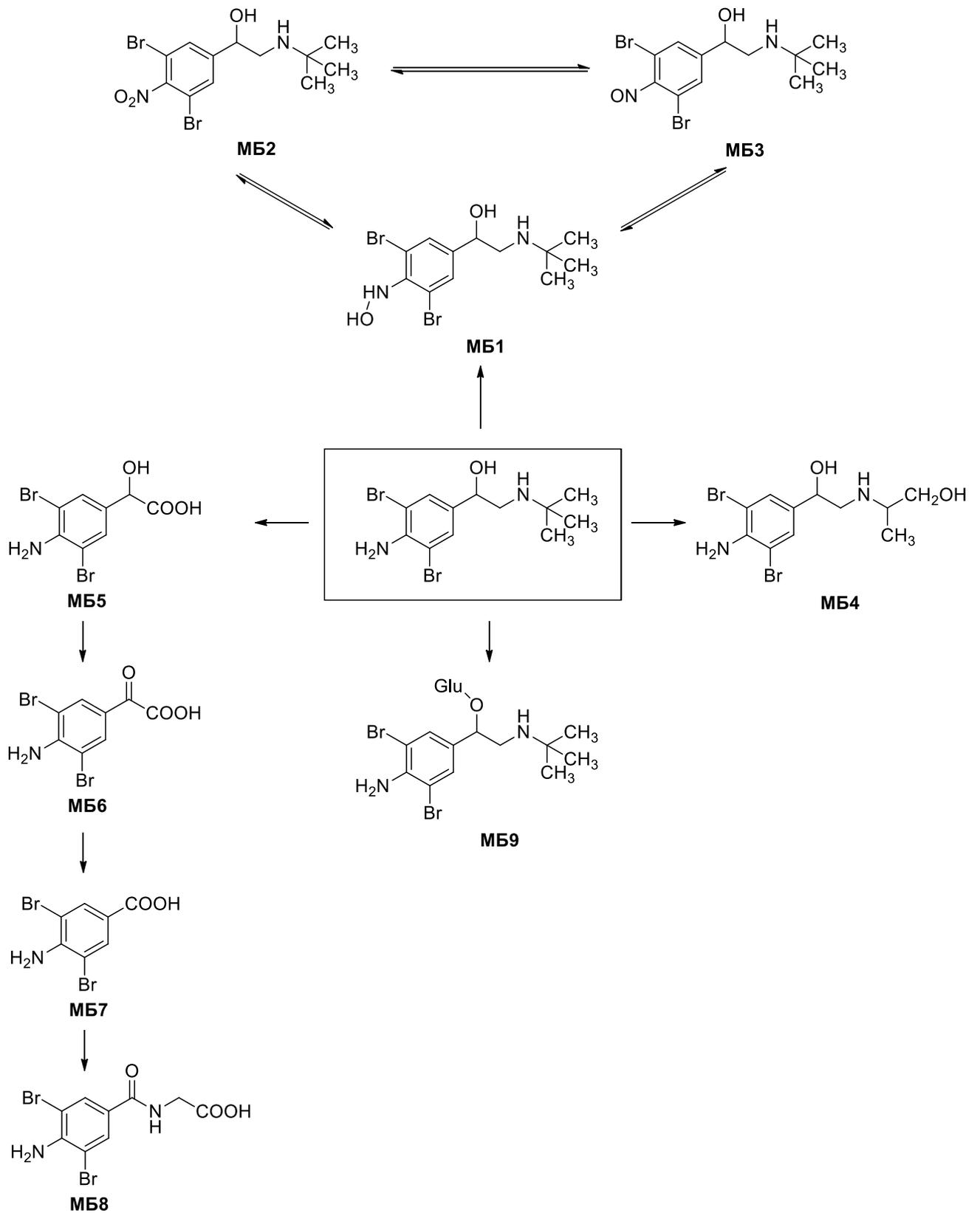


Рисунок 1.61 – Пути биотрансформации бромбутерола

1.4.3 Метаболизм вилантерола

Вилантерол – новый селективный β_2 -агонист длительного действия (эффект сохраняется 24 ч). Снижает бронхиальную гиперреактивность и уменьшает ранний и поздний астматический ответ на воздействие аллергена у больных бронхиальной астмой. Применяется для клинического лечения хронических обструктивных болезней легких в сочетании с ингаляционными кортикостероидами. Прием всех исследованных дозировок сопровождался низкой частотой побочных эффектов [121-123].

Вилантерол представляет собой метаболически лабильный β_2 -агонист длительного действия, который подвергается превращению в микросомах человека в метаболиты со значительно более низкой активностью по отношению к β_2 -адренорецепторам и демонстрируют низкую системную экспозицию *in vivo* после вдыхания дозы [124].

В исследованиях [125, 126] изучался метаболизм вилантерола после однократного перорального введения 200 мг [^{14}C]-вилантерола шести здоровым мужчинам. Метаболиты вилантерола у животных и человека представлены на рисунке 1.62.

Основными путями метаболизма вилантерола в гепатоцитах человека было О-деалкилирование до метаболита **МВ4** с последующим окислением до **МВ7**, что составило приблизительно 24 % и 12 % от общего объема выделенных веществ, соответственно. До 78 % восстановленной дозы (во всех экскрементах) было потенциально связано с О-деалкилированными метаболитами, что согласуется с метаболизмом вилантерола человека *in vitro*. N-деалкилирование до **МВ1** и С-деалкилирование до **МВ2** были второстепенными путями биотрансформации у человека, составляющими всего 5 % восстановленной дозы. О-, N- и С-деалкилирование также были путями метаболизма у крыс и собак, используемыми для токсикологических исследований вилантерола.

Неизменный вилантерол в фекалиях человека (5 % восстановленной пероральной радиоактивной дозы) представлял собой либо неабсорбированную дозу, либо абсорбированный, но неизменный вилантерол или конъюгат **МВ8**, выделяемый непосредственно в ЖКТ или через желчь человека.

Метаболиты в плазме человека также были в основном продуктами О- или С-деалкилирования, с последующим окислением, в сходном диапазоне метаболитов,

наблюдаемых в моче человека и при инкубации *in vitro*. Самые большие радиоактивные хроматографические пики в плазме человека были обозначены как **MB4**, **MB2** и многокомпонентный пик, содержащий **MB6** и другие О-деалкилированные метаболиты (**MB9**, **MB10**, **MB11**, **MB12**). Метаболиты **MB7** и **MB5** были также обнаружены с помощью неколичественной ВЭЖХ-МС (хотя и в низких концентрациях) в плазме человека после многократного ингаляционного введения здоровым пациентам.

О-Деалкилирование было заметным путем метаболизма у всех видов животных, за исключением мышей, где основным путем был продукт прямой глюкуронидации вилантерола **MB8**.

О-Деалкилирование вилантерола до **MB4** и последующая О-глюкуронидация до **MB9** (примерно 40 % от выделенных метаболитов) были основным путем биотрансформации вилантерола у крыс.

Продукт С-деалкилирования **MB2** – основной путь разложения вилантерола в гепатоцитах собак и кроликов, что составляет примерно 43 % от выделенных метаболитов.

Все системноциркулирующие метаболиты, за исключением **MB3** (окислительный метаболит), были продуктами О- и С-деалкилирования и проявляли незначительную фармакологическую активность.

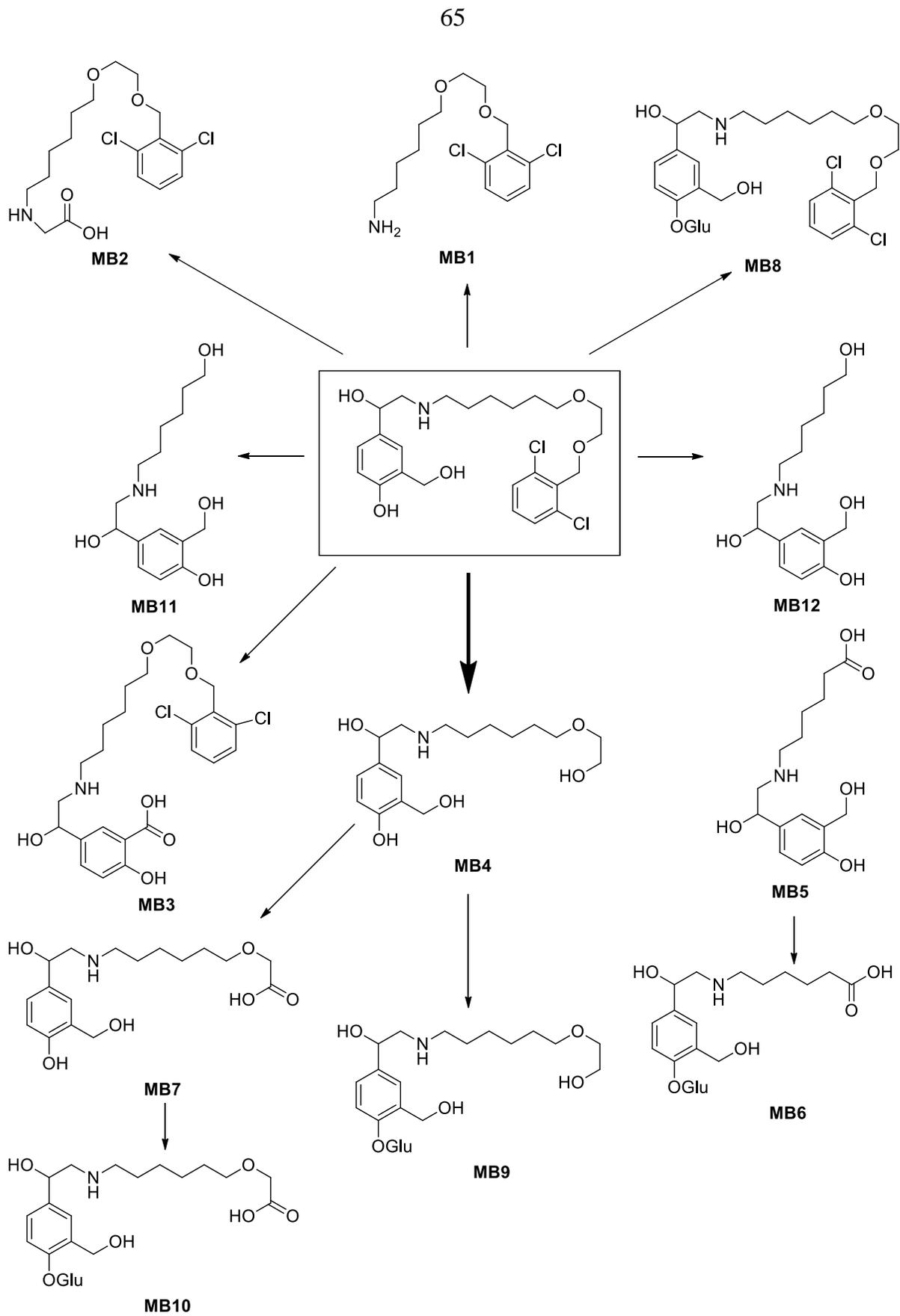


Рисунок 1.62 – Пути биотрансформации вилантерола

1.5 Методы анализа β -агонистов и их метаболитов в биологических средах

Одна из целей работы – изучение фармакокинетических характеристик ряда β -агонистов и разработка и апробация методики одновременного определения целевых соединений и их метаболитов в субпродуктах, поступающих на российский рынок из-за рубежа. В этом разделе будут рассмотрены методы определения β -агонистов в моче, крови и печени.

Для анализа β -агонистов в биологических средах и продуктах питания используют различные аналитические методы: жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [127-144], газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [145-148], иммуноферментного анализа [151-154], иммуносенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса [155], электрохимического иммуносенсора [156]. Скрининг остаточных количеств β -агонистов в мясных продуктах может быть проведен быстро и недорого с использованием иммунохимических тестов, но для подтверждения, точной количественной оценки и возможности определения соединений в низких концентрациях требуются хроматографические методы в сочетании с масс-спектрометрией. При использовании методов газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) возникает ряд ограничений и усложнений в процедурах подготовки проб, заключающихся в обязательном проведении дериватизации, которая вносит дополнительные погрешности и увеличивает вариабельность результатов измерений. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) особо важен в качественном и количественном анализе следовых количеств β -агонистов. Для более достоверного определения целевых соединений используют метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР) [127-129] или ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в режиме мониторинга селективных реакций [130-142]. Но, несмотря на все преимущества, метод ВЭЖХ-МС имеет также ряд ограничений, связанных с матричным эффектом. По этой причине для анализа биологических образцов методом ВЭЖХ-МС требуется предварительная очистка проб. Далее будут рассмотрены способы пробоподготовки мочи, крови и печени.

Подготовку проб мочи, как правило, осуществляют в три этапа: проведение гидролиза для разрушения конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами, экстракция целевых компонентов в щелочных условиях для избежания протонирования аминогруппы, концентрирование экстракта. В большинстве случаев конъюгаты разрушают ферментативным гидролизом с использованием β -глюкуронидазы / арилсульфатазы [127-134]. Реакцию проводят в среде ацетатного буфера при температуре 37 °С либо 50 °С. В источнике [131] приведены условия кислотного гидролиза при температуре 80 °С с использованием 10 М раствора соляной кислоты. После проведения гидролиза рН полученных проб доводят до 8-9 с помощью растворов гидроксида натрия или гидроксида калия.

Следующим этапом пробоподготовки является экстракция целевых компонентов из проб, которую осуществляют либо методом жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), либо методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Для проведения ЖЖЭ используют такие растворители как этилацетат [130], *трет*-бутилметилвый эфир и смесь *трет*-бутанол / *трет*-бутилметилвый эфир (1:5) [131]. Для проведения ТФЭ используют картриджи с различными типами сорбентов:

- С18 (гидрофобный сорбент на основе силикагеля с привитым алкильным радикалом С18), элюент – метанол [133];

- НЛВ (гидрофильно-липофильный сорбент, состоящий из монодисперсных частиц смолы сополимера N-винилпирролидона и дивинилбензола со специальной смесью гидрофильных и гидрофобных групп), элюент – метанол [129];

- МСХ (полимерный сорбент смешанного действия, который сочетает в себе неполярный и сильный катионообменный удерживающий механизм, оптимизированный для извлечения основных соединений с катионообменными группами), элюент – 5 % раствор аммиака в метаноле, либо 3 % раствор аммиака в этилацетате [127, 134].

После экстракции пробы высушивают досуха и перерастворяют в подвижной фазе в количестве, необходимом для проведения анализа.

Для извлечения метаболитов β -агонистов из мочи, как и в случае целевых соединений, проводят ферментативный гидролиз с последующей ЖЖЭ с использованием смеси этилацетат / ацетон (3:1) [26]. В литературе [143] описан способ извлечения

метаболитов без стадии гидролиза, экстракцию проводят из мочи, разбавленной формиатным буфером, методом ТФЭ. В данном эксперименте использованы картриджи Bond Elut Plexa, у которых сорбентом является неполярный нейтральный полимер, подходящий для экстракции кислых, нейтральных и основных аналитов из различных образцов. Также в литературе описан более простой способ пробоподготовки для анализа продуктов биотрансформации: к пробам мочи добавляют метанол для осаждения белков и надосадочный слой анализируют [118].

Подготовку проб крови осуществляют либо с проведением ферментативного гидролиза в среде ацетатного буфера при температуре 37°C [127], либо без него [145, 144]. Как и в случае пробоподготовки мочи извлечение целевых компонентов из образцов проводят либо методом ЖЖЭ с использованием этилацетата [145] или смеси изопропанол / *n*-гексан (5:95) [144], либо методом ТФЭ с использованием картриджей с сорбентом МСХ, элюирование проводят 5 % раствором аммиака в метаноле [127]. Перед ЖЖЭ рН проб доводят до 8-9 с помощью раствора гидроксида натрия. На конечном этапе пробы концентрируют досуха и перерастворяют в подвижной фазе.

По сравнению с мочой и кровью печень, а также другие органы и ткани являются более сложными матрицами и извлечь β -агонисты из них составляет большого труда. Для проведения пробоподготовки на первом этапе навеску печени гомогенизируют. Затем к измельченному образцу добавляют либо ацетатный буфер [127, 133, 135, 136], либо цитратный [137] и β -глюкуронидазу / арилсульфатазу для проведения ферментативного гидролиза. Реакцию проводят при температуре 37-40 °С. В нескольких литературных источниках описаны дополнительные стадии очистки проб после гидролиза: обезжиривание гексаном [127] или гептаном [138], экстракция такими растворителями как этилацетат [138], растворы хлорной кислоты [135]. рН полученных проб доводят до 8-9 с помощью раствора гидроксида натрия. В подавляющем большинстве случаев для экстракции целевых компонентов используют метод ТФЭ. При этом применяют картриджи со следующими типами сорбентов:

- С18, элюент – метанол [133, 149];

- МСХ, НСХ (аналог сорбента МСХ), элюент – 5 % раствор аммиака в метаноле [127, 137];

- MIP (молекулярно-импринтированные полимеры, представляют собой синтетические материалы с искусственно созданными сайтами узнавания, способными специфически связывать целевую молекулу, а не близкородственные соединения), элюент – 10 % уксусная кислота в метаноле [138, 139, 150].

Для уменьшения влияния матричных примесей и получения более чистого конечного экстракта проводят двухэтапную ТФЭ. В статье [135] предложен вариант очистки экстракта на сорбенте HLB (элюирование смесью метанол / вода (70:30)) с последующей очисткой на сорбенте MCX (элюирование 3 % раствором аммиака), а в статье [140] – очистка на сорбенте C18 (элюирование 4 % раствором аммиака в метаноле) с последующей очисткой на сорбенте SCX (аналог сорбента MCX, элюирование 1,3 % раствором аммиака в этилацетате).

Также в литературе встречаются варианты экстракции целевых компонентов в кислых условиях из гомогенизированных образцов печени без проведения гидролиза. Для этого используют раствор хлорной кислоты [140] или раствор соляной кислоты [141, 149]. Для более полного извлечения аналитов экстракцию проводят неоднократно.

ГЛАВА 2 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Синтез β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов

2.1.1 Синтез кленпроперола, кленбутерола, кленпентерола

В настоящее время в литературных источниках представлено всего несколько способов получения кленбутерола (**5б**) (раздел 1.2.1) [11-15], представляющих из себя многостадийные схемы синтеза, реализация которых требует значительных затрат. Кленбутерол (**5б**) и его ближайшие структурные аналоги кленпроперол (**5а**) и кленпентерол (**5в**) получали по разработанной схеме с использованием коммерчески доступных реагентов, являющейся в своем роде обобщением методик, описанных в литературе (рисунок 2.1). На ключевых стадиях синтеза 3,5-дихлор-4-амино-2'-бромацетофенон (**3**) конденсировали непосредственно с соответствующими аминами при соотношении реагентов 1:2,5 в среде толуола при комнатной температуре в течение ночи. Затем в полученных α -аминокетонах (**4а-в**) кето-группу восстанавливали до спиртовой действием борогидрида натрия при соотношении реагентов 1:1 в среде метанола в течение 2 ч. Выход гидрохлоридов ацетофенонов **4а** и **4б** составил 26 %, **4в** – 27 %. Целевые кленпроперол (**5а**), кленбутерол (**5б**) и кленпентерол (**5в**) были очищены методом колоночной хроматографии и переведены в форму гидрохлоридов с выходом 13 %, 15 % и 15 %, соответственно.

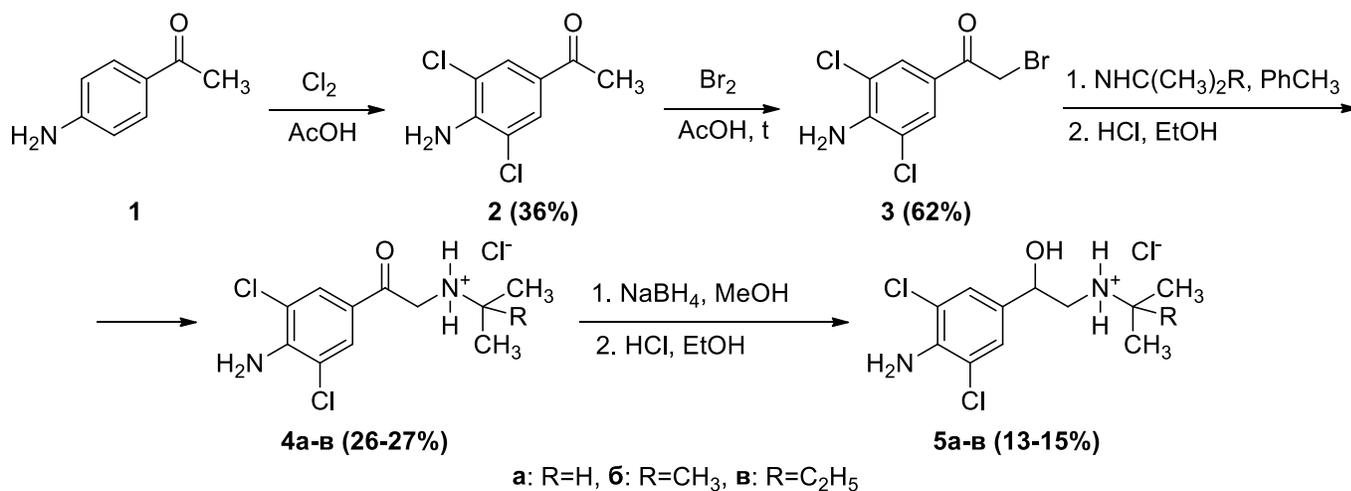


Рисунок 2.1 – Схема синтеза кленпроперола (**5а**), кленбутерола (**5б**), кленпентерола (**5в**)

Необходимый для данных превращений 4-амино-2',3,5-трихлорацетофенон пытались получить хлорированием 4-аминоацетофенона (1). Раствор хлора в уксусной кислоте прибавляли по каплям к раствору 4-аминоацетофенона (1) при соотношении реагентов 3:1.

Однако в результате реакции была получена смесь ди- и трихлорпроизводных, разделить которые не удалось из-за сходства их физико-химических свойств. По данным ТСХ в реакционной массе содержался еще ряд продуктов. В связи с этим альтернативно использовали 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенон (3). Для этого 4-аминоацетофенон (1) обрабатывали раствором хлора в уксусной кислоте при соотношении реагентов 1:2 и получали 4-амино-3,5-дихлорацетофенон (2) с выходом 36 %. Ацетофенон 2 бромировали в уксусной кислоте при температуре 60-70 °С с получением 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (3) с выходом 62 %.

В немецком патенте [13] бромирование 4-амино-3,5-дихлорацетофенона проводили также с использованием молекулярного брома в качестве бромирующего агента. Реакцию проводили в среде диэтилового эфира при комнатной температуре в течение 10 ч, выход продукта составил 21 %. Проведение данной реакции в среде уксусной кислоты при прибавлении брома в один прием и перемешивании реакционной массы в течение 10 мин при температуре 60-70 °С позволило увеличить выход продукта в 3 раза.

2.1.2 Синтез бромбутерола

Несмотря на то, что в литературе описан достаточно подробный способ получения бромбутерола (8) с высоким выходом как промежуточных продуктов, так и целевого препарата (раздел 1.2.2) [16], была разработана альтернативная трехстадийная схема синтеза данного соединения с применением доступных реагентов (рисунок 2.2). Вместо дорогостоящего триметилфениламмонийтрибромиды, предложенного бразильскими учеными, в качестве бромирующего агента использовали молекулярный бром. В соответствии с разработанной схемой на первой стадии 4-аминоацетофенон (1) обрабатывали бромом в уксусной кислоте при соотношении реагентов 1:2, поддерживая температуру реакционной массы не выше 60 °С в течение 30 мин, с образованием 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона (6) с выходом 40 %. Затем трибромацетофеноном 6

алкилировали *трет*-бутиламин при соотношении реагентов 1:2,3 в среде толуола и полученный аминацетофенон **7** переводили в форму гидрохлорида с выходом 23 %. На конечной стадии в соединении **7** восстанавливали кето-группу до спиртовой действием борогидрида натрия в среде метанола с образованием бромбутерола (**8**). После очистки технического продукта методом колоночной хроматографии получали бромбутерол с выходом 11 %.

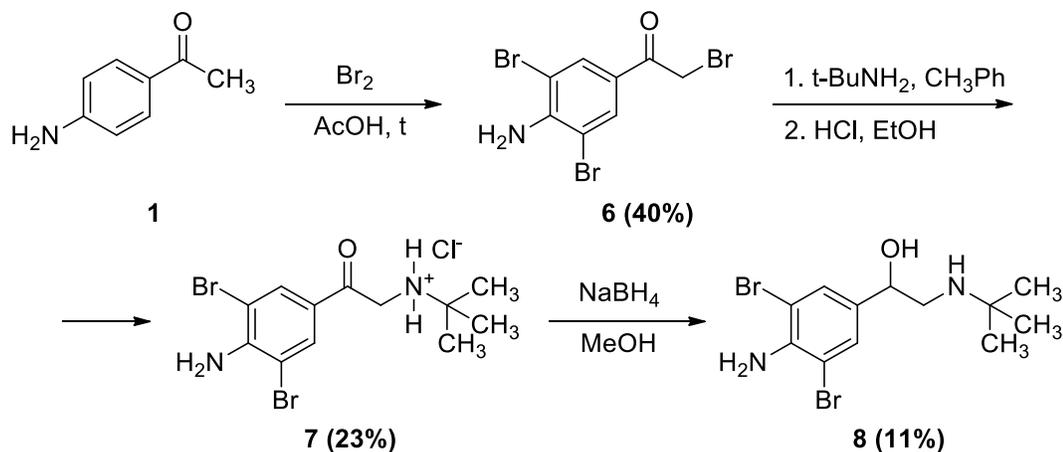


Рисунок 2.2 – Схема синтеза бромбутерола (**8**)

Стоит отметить, что при исследовании бромбутерола (**8**) методом ¹H ЯМР-спектроскопии выявлено существенное упрощение спектра при смене растворителя дейтерохлороформа на дейтеродиметилсульфоксид. Водородные связи, стабилизирующие молекулу в первом растворителе, затрудняют вращение вокруг связей, что приводит к неэквивалентности протонов метиленовой группы. В результате, их сигналы наблюдаются в области 2.52 и 2.85 м.д. в виде дублета дублетов с КССВ 11,7 и 8,9 и 12,1 и 3,2 Гц.

2.1.3 Синтез тулобутерола

Для синтеза тулобутерола (**11**) за основу был взят способ, описанный в литературе (раздел 1.2.3) [19], с применением 2-(2-хлорфенил)оксирана. Для его получения 2'-бром-2-хлорацетофенон восстанавливали борогидридом натрия до бромгидрина, превращающегося в 2-(2-хлорфенил)оксиран (**10**) после обработки щелочью. Промежуточный оксиран **10** был получен по реакции Кори-Чайковского в результате метилирования 2-хлорбензальдегида (**9**) диметилсульфонийметилидом, генерируемым *in*

situ из триметилсульфоний иодида и *трет*-бутилата калия в среде ДМСО при температуре 5 °С, аналогично методикам [157, 158] (рисунок 2.3). Выход 2-(2-хлорфенил)оксирана (**10**) после вакуумной перегонки составил 26 %. Тулобутерол с выходом 59 % получали в результате конденсации оксирана **10** с *трет*-бутиламином при соотношении реагентов 1:1,3 в присутствии воды. Целевой продукт очищали методом колоночной хроматографии и переводили в форму гидрохлорида **11**, выход которого составил 91 %.

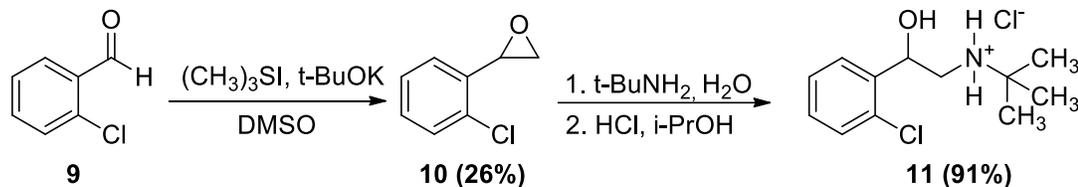


Рисунок 2.3 – Схема синтеза тулобутерола (**11**)

2.1.4 Синтез 4-гидрокситулобутерола

4-Гидрокситулобутерол (**17**) – селективный β_2 -агонист, сравнительно недавно появившийся на рынке лекарственных средств под названием мелуадрин тартрат в виде *R*-энантиомера [25]. В то же время данное соединение является одним из главных метаболитов тулобутерола (**11**), образующимся в результате его моногидроксилирования [26, 120]. При изучении механизма действия 4-гидрокситулобутерола (**17**) было показано, что данный метаболит оказывает более выраженный расслабляющий эффект на трахею морских свинок, чем тулобутерол (**11**), и обладает более высокой активностью [17].

В статье, посвященной синтезу тулобутерола (**11**), представлены три способа получения его метаболита 4-гидрокситулобутерола (**17**) (раздел 1.2.4) [19]. Для синтеза данного соединения разработали альтернативную четырехстадийную схему (рисунок 2.4). Вначале в результате конденсации 3-хлорфенола (**12**) с двухкратным избытком хлороформа в присутствии гидроксида кальция и карбоната натрия при кипячении по реакции Реймара-Тиммана с невысоким выходом (6 %) получали минорный 4-гидрокси-2-хлорбензальдегид (**13**) по методике, предложенной Худгсоном и Дженкинсоном [159]. Стоит отметить, что вначале из реакционной массы в результате перегонки с водяным паром был отделен мажорный 2-гидрокси-4-хлорбензальдегид. В результате бензилирования 4-гидрокси-2-

хлорбензальдегида (**13**) бензилхлоридом при соотношении реагентов 2,6:1, аналогично методике, приведенной в патенте корейских авторов [160], в присутствии карбоната калия в среде ацетонитрила вводили по гидроксигруппе бензильную защиту. Выход продукта **14** составил 53 %. В результате метилирования бензальдегида **14** по реакции Кори-Чайковского диметилсульфонийметилдом, генерируемым *in situ* из триметилсульфоний йодида и *трет*-бутилата калия в среде ДМСО, аналогично [157, 158], получали 2-(4-бензилокси-2-хлорфенил)оксиран (**15**) с выходом 93 %. Затем в результате конденсации оксирана **15** с *трет*-бутиламином при соотношении реагентов 1:5,7 в воде при кипячении с выходом 48 % синтезировали 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-*трет*-бутиламино-1-этанол (**16**). На финальной стадии для снятия бензильной защиты не воспользовались методикой японских ученых [19], проводивших гидролиз бромоводородной кислотой при нагревании, а выбрали более мягкий вариант гидрогенолиза в присутствии 5 %-ного палладия на угле. Реакцию проводили при комнатной температуре и давлении водорода 1 атм. Выход целевого 4-гидрокситулобутерола (**17**) составил 35 %. Стоит отметить, что продукты **14**, **16** и **17** очищали методом колоночной хроматографии.

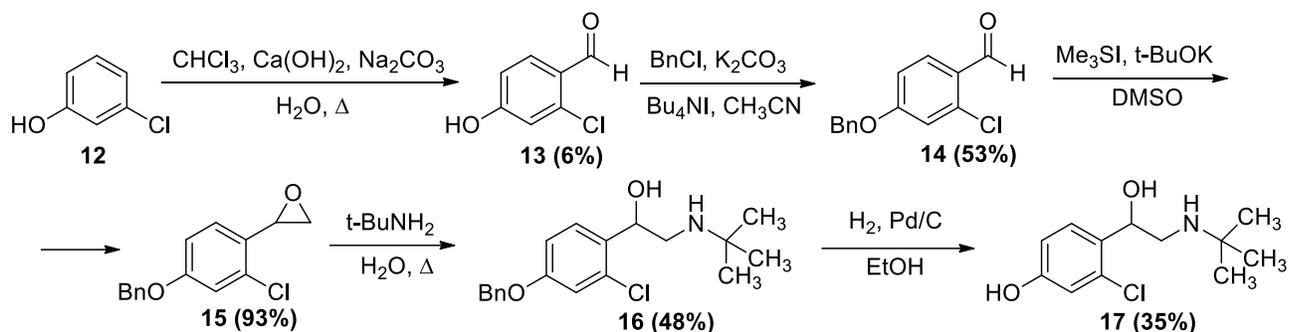


Рисунок 2.4 – Схема синтеза 4-гидрокситулобутерола (**17**)

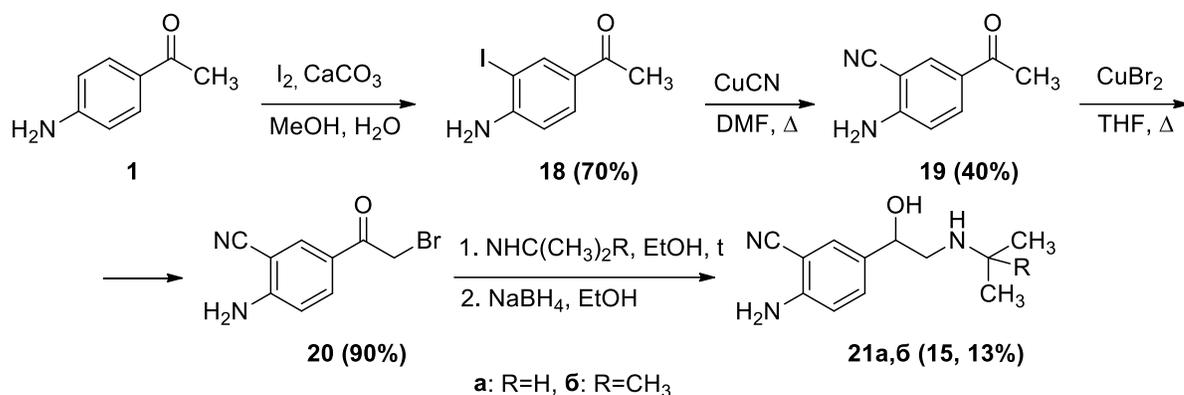
Гидрогенолиз, проведенный при давлении водорода 5 атм, протекает не так однозначно, как предполагали: наряду с ожидаемым 4-гидрокситулобутеролом (**17**) в смеси был обнаружен также продукт его гидродехлорирования – 2-*трет*-бутиламино-1-(4-гидроксифенил)этанол в количестве 30 % мольн.

2.1.5 Синтез циматерола и цимбутерола

При поиске способов получения циматерола (**21a**) и цимбутерола (**21b**) в литературе была найдена схема синтеза циматерола (**21a**) (раздел 1.2.5) [27]. Данная схема представляется достаточно реальной, однако обнаружить сведения о методике проведения стадии ацилирования 2-ациламинобензонитрила хлорацетилхлоридом не удалось, поскольку в присутствии такого катализатора реакции ацилирования, как безводный хлорид алюминия, происходит и трансформация нитрильной группы. Попытки осуществить данную стадию с использованием других кислот Льюиса к желаемому результату не привели.

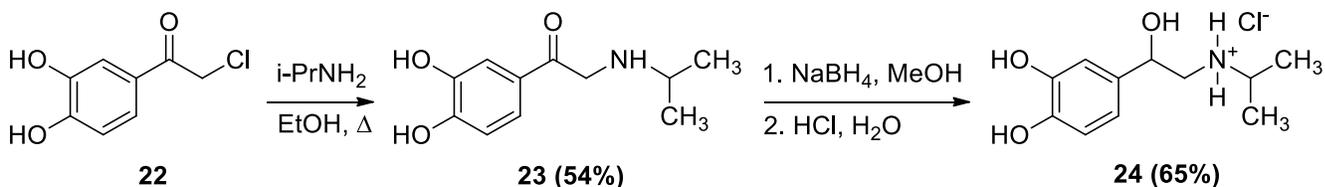
В связи с этим для получения циматерола (**21a**) и цимбутерола (**21b**) за основу была выбрана другая схема синтеза данных соединений, описанная в литературе [28-30]. В качестве исходного соединения в данном случае использовали коммерчески доступный 4-аминоацетофенон (**1**) (рисунок 2.5). На первой стадии возможно получение либо 3-бромпроизводного [28, 29, 161], либо 3-йодпроизводного [113]. Для апробирования выбрали схему синтеза через промежуточный 4-амино-3-йодацетофенон (**18**).

Согласно разработанному методу, на первой стадии 4-аминоацетофенон (**1**) обрабатывали двухкратным избытком молекулярного йода в присутствии карбоната кальция в среде метанола с образованием 3-йодпроизводного **18** с выходом 70 %. В синтезированном соединении **18** атом йода замещали на циано-группу действием цианида меди при соотношении реагентов 1:2. Реакцию проводили при кипячении в среде ДМФА, выход продукта **19** составил 40 %. На следующем этапе замещенный ацетофенон **19** бромировали дибромидом меди при соотношении реагентов 1:1,8 при кипячении в среде ТГФ с образованием 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**), выход которого составил 90 %. Затем бромацетофенон **20** непосредственно вводили во взаимодействие с двухкратным избытком соответствующих аминов в среде этанола при температуре 50 °С и полученный α -кетон без выделения из реакционной массы восстанавливали борогидридом натрия. Конечные продукты **21a,б** очищали методом колоночной хроматографии, выход **21a** составил 15 %, **21b** – 13 %.

Рисунок 2.5 – Схема синтеза циматерола (**21a**) и цимбутерола (**21b**)

2.1.6 Синтез изопротеренола

В результате проведенного литературного поиска для синтеза изопротеренола (**24**) была выбрана двухстадийная схема получения данного соединения (раздел 1.2.6) [31-36] (рисунок 2.6). На первой стадии кипячением 3,4-дигидрокси-2'-хлорацетофенона (**22**) с изопропиламином при соотношении реагентов 1:18,5 в этиловом спирте получали соответствующий аминокетон **23** с выходом 54%. Согласно литературным данным [32], восстановление кето-группы до спиртовой в аминокетоне **23** проводили реакцией каталитического гидрирования в присутствии 10%-ного палладия на угле при давлении водорода 50 атм. Аминокетон **23** был восстановлен в более мягких условиях с использованием борогидрида натрия в метаноле. Продукт выделяли в форме гидрохлорида **24** с суммарным выходом на заключительной стадии 65%.

Рисунок 2.6 – Схема синтеза изопротеренола (**24**)

2.1.7 Синтез метапротеренола и тербуталина

Несмотря на то, что в литературе представлено несколько способов получения метапротеренола (**30a**) и тербуталина (**30б**) (раздел 1.2.7), предложена четырехстадийная схема синтеза данных соединений с использованием доступных реагентов (рисунок 2.7). Вначале в результате бензилирования 3,5-дигидроксиацетофенона (**25**) бензилхлоридом при соотношении реагентов 1:3, аналогично методике, приведенной в патенте корейских авторов [160], в присутствии карбоната калия в среде ацетонитрила при температуре 50 °С при катализе ТЭБАХ по гидроксигруппам вводили бензильную защиту. После высоковакуумной перегонки продукт **26** выделяли с выходом 86 %. Бромирование полученного ацетофенона **26** проводили в диэтиловом эфире бромом при соотношении реагентов 1:1 при пониженной температуре, аналогично патенту [43]. После перекристаллизации удалось получить 3,5-дибензилокси-2'-бромацетофенон (**27**) с выходом 64 %. На следующем этапе пытались получить бензилированные аналоги целевых соединений, однако, в результате конденсации бромацетофенона **27** с соответствующими аминами в ацетонитриле при комнатной температуре в течение продолжительного времени по данным хромато-масс-спектрометрии была получена смесь, в которой преобладал 2'-оксо-(3,5-дибензилоксифенил)ацетальдегид.

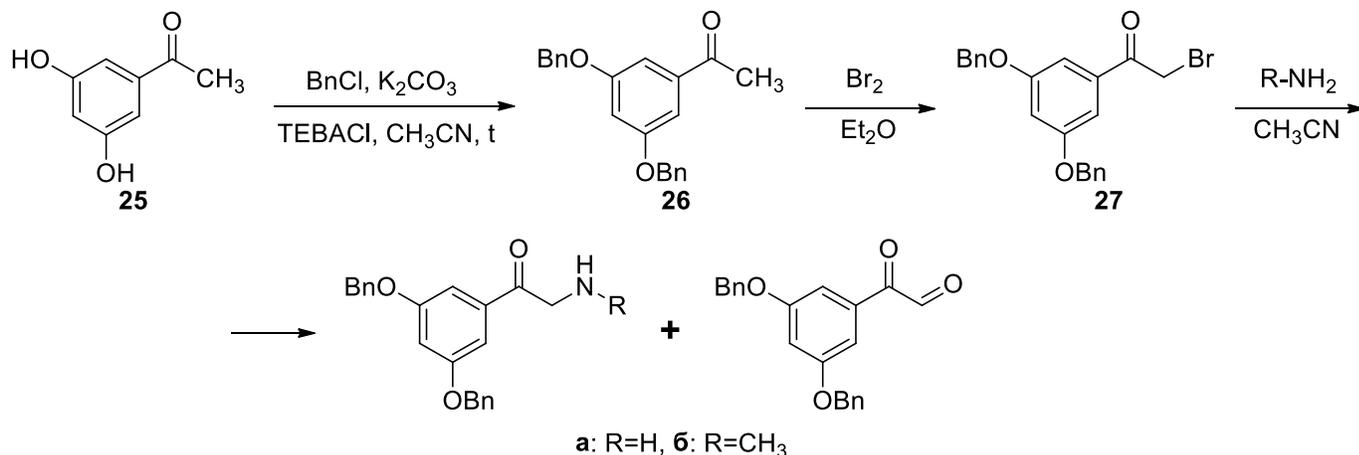


Рисунок 2.7 – Предложенная схема синтеза метапротеренола (**30a**) и тербуталина (**30б**)

В качестве альтернативной была выбрана методика через образование промежуточного бромгидрина **28**, полученного в результате восстановления 3,5-дибензилокси-2'-бромацетофенона (**27**) борогидридом натрия в метаноле при

соотношении реагентов 1:1, которое протекало с достаточно высоким выходом 59 % (рисунок 2.8). После дополнительной очистки фильтрата добавочно выделили 31 % бромацетофенона **27**, его суммарный выход составил 90 %. Таким образом, схема была преобразована в пятистадийную. Затем были получены бензилированные метапротеренол (**29a**) и тербуталин (**29б**) с выходами 66 % и 63 %, соответственно, в результате реакции алкилирования бромгидрином **28** соответствующих аминов при соотношении реагентов 1:8. Реакцию проводили в среде изопропанола при кипячении. Продукт **29a** дополнительно перекристаллизовали из смеси этанол / диэтиловый эфир (1:1) и получали 36 % О,О-добензилметапротеренола (**29a**). Снятие бензильной защиты гидрогенолизом в присутствии 10 %-ного палладия на угле привело к целевым соединениям **30a,б**. Выход метапротеренола (**30a**) в свободной форме составил 80 %, тербуталина (**30б**) после перевода в форму гидрохлорида – 84 %.

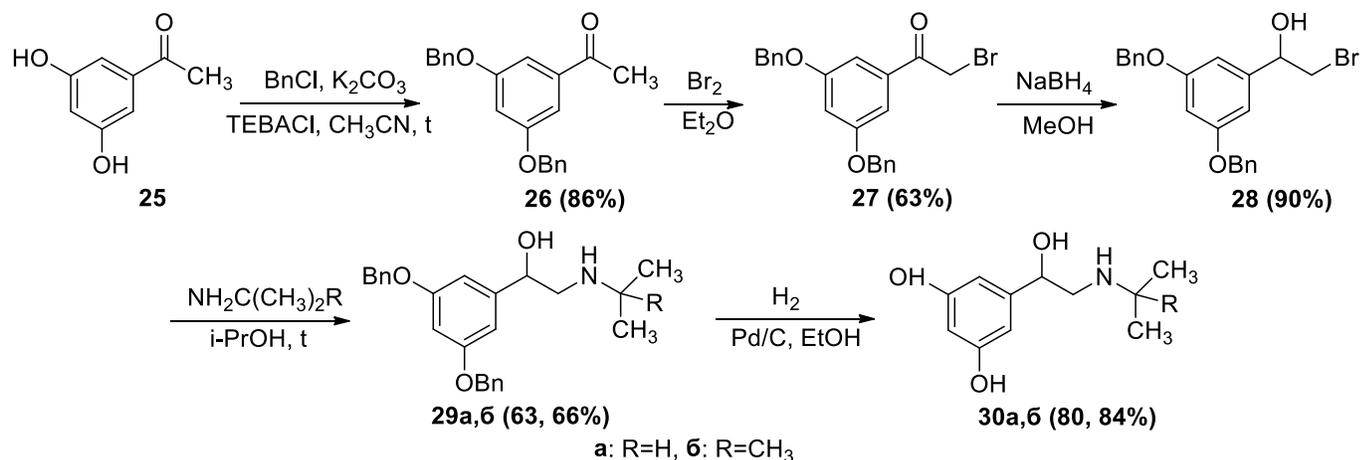


Рисунок 2.8 – Схема синтеза метапротеренола (**30a**) и тербуталина (**30б**)

2.1.8 Синтез рактопамина

Предложенные в литературе трех- и четырехстадийные способы синтеза рактопамина (**33**) в качестве исходных предусматривают использование либо О-бензилированных, либо О-метилованных производных 4-гидрокси-2'-бромацетофенона и 4-(4-гидроксифенил)бутан-2-амина (раздел 1.2.8) [52, 55]. Если учитывать, что исходные соединения могут быть получены из коммерчески доступного сырья в результате пятистадийного синтеза, то предложенные схемы получения

рактопамина требуют осуществления минимум восьми- или девятистадийного синтеза. По этой причине, для синтеза рактопамина (**33**) разработали простой двухстадийный *one pot* синтез из коммерчески доступных реагентов (рисунок 2.9). В результате восстановительного аминирования 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она (**31**) октопамином (**32**) при соотношении реагентов 1:1 с выходом 33 % получали гидрохлорид рактопамина (**33**). Реакцию проводили при комнатной температуре в метаноле при использовании трехкратного избытка борциангидрида натрия. Суммарный выход рактопамина по предложенным в литературе методам без учета получения исходных O-замещенных производных 4-гидрокси-2'-бромацетофенона и 4-(4-гидроксифенил)бутан-2-амина составил 3 %. Таким образом, разработанный способ синтеза позволил увеличить выход продукта минимум в 10 раз.

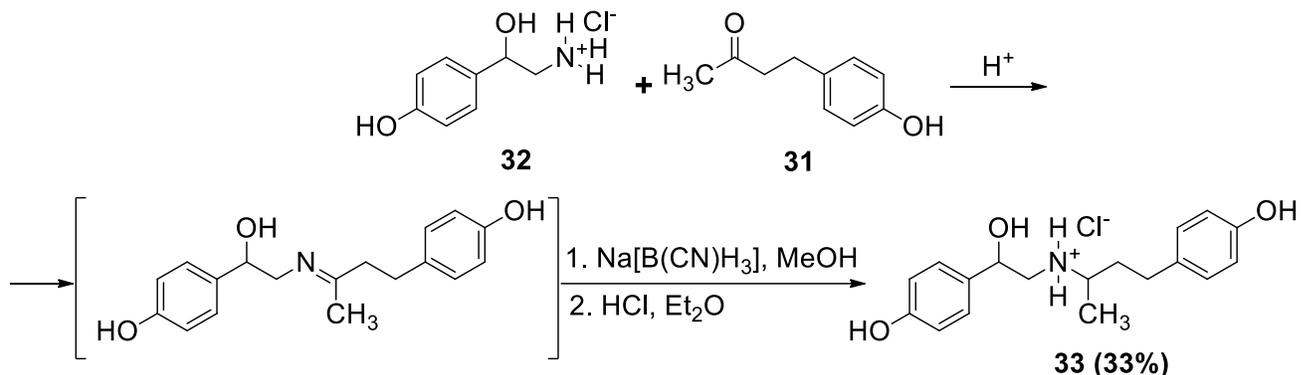


Рисунок 2.9 – Схема синтеза рактопамина (**33**)

2.1.9 Синтез добутамина

Согласно литературным источникам, для синтеза добутамина (**35**) также в качестве исходных используют соединения с защищенными гидроксигруппами [60, 62-65], получение которых значительно увеличивает количество стадий синтеза (раздел 1.2.9). Для получения добутамина (**35**) была выбран двухстадийный *one pot* синтез из доступных реагентов (рисунок 2.10). Целевое соединение **35** получали в результате реакции восстановительного аминирования 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она (**31**) дофамином (**34**) при соотношении реагентов 1:1 в среде метанола с использованием двухкратного избытка

борциангидрида натрия. Добутамин (**35**) дополнительно очищали на полупрепаративном хроматографе, выход продукта составил 31 %.

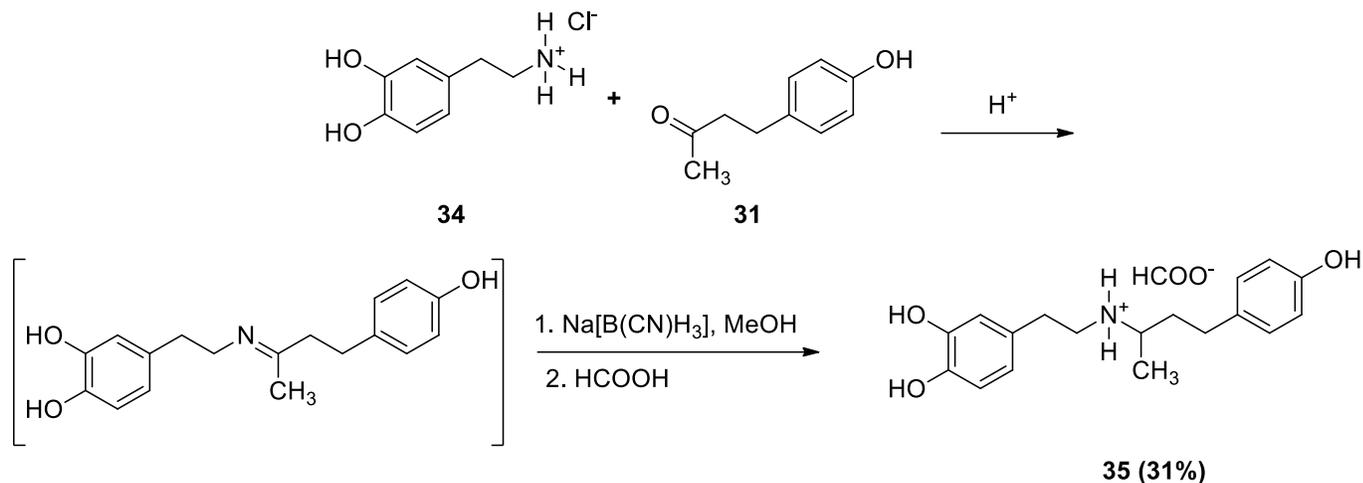


Рисунок 2.10 – Схема синтеза добутамина (**35**)

2.1.10 Синтез ритодрина

На основании литературных данных (раздел 1.2.10) [52, 68, 69] была выбрана пятистадийная схема синтеза ритодрина (**42**) с использованием доступных реагентов (рисунок 2.11). Изначально в результате алкилирования бокированного тирамина **36** бензилхлоридом при соотношении реагентов 1:1 в присутствии карбоната калия в кипящем ацетонитриле получали N-[2-(4-бензилоксифенил)этил]-O-*трет*-бутилкарбамат (**37**) с выходом 88 %. После снятия БОК-защиты трифторуксунной кислотой почти с количественным выходом (94 %) синтезировали O-бензилтирамин **38**, который далее алкилировали 1-(4'-бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-оном (**39**) при соотношении реагентов 1:1 в этаноле при температуре 50 °С. Затем полученный α -аминопропиофенон **40** без выделения восстанавливали борогидридом натрия до соответствующего спирта **41**. После его очистки методом колоночной хроматографии суммарный выход аминпропанола **41** на две стадии составил 25 %. На завершающей стадии дебензилирование аминспирта **41** проводили путем гидрогенолиза в присутствии 5 %-ного палладия на угле при комнатной температуре и давлении водорода 1.1 атм. Полученный

продукт очищали методом колоночной хроматографии и переводили в форму гидрохлорида ритодрина (**42**) с выходом 82 %.

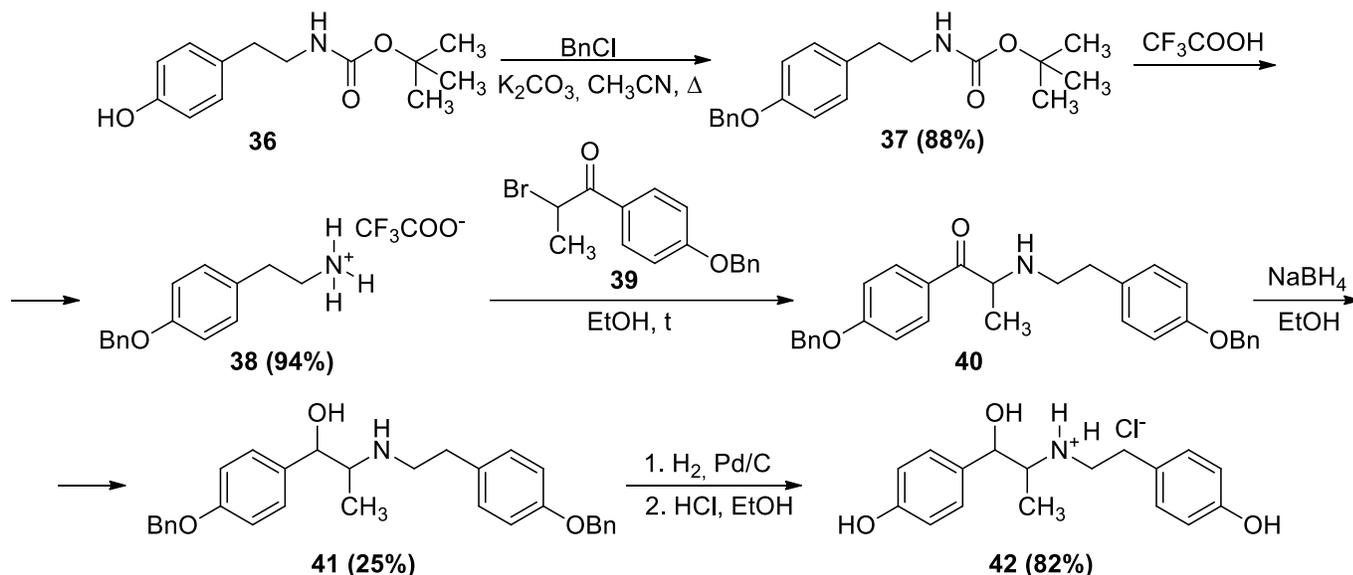


Рисунок 2.11 – Схема синтеза ритодрина (**42**)

2.1.11 Синтез прокатерола

Наиболее выполнимый способ синтеза прокатерола (**49**) описан японскими учеными (раздел 1.2.11) [77]. Данный метод заключается в ацилировании 8-гидроксихинолин-2-она с последующим N-алкилированием изопропиламина и восстановлением кето-группы до спиртовой. При поиске оптимального метода получения целевого соединения необходимо синтезировать исходный 8-гидроксихинолин-2-он (**46**). В связи с этим для получения прокатерола (**43**) разработали шестистадийную схему его синтеза с использованием доступных реагентов (рисунок 2.12). Первоначально по известной методике [84] в результате окисления перекисью водорода 8-гидроксихинолина (**43**) в присутствии катализатора дигидрата вольфрамата натрия в среде метанола при кипячении получали N-оксид 8-гидроксихинолина (**44**) с выходом 63 %, который далее подвергли реакции O-ацилирования и $\text{N}^1\text{-C}^2$ -перегруппировке под действием уксусного ангидрида при соотношении реагентов 1:16 при температуре 100°C в атмосфере аргона с выходом продукта **45** 88 %. Затем полученный ацетат **45** гидролизовали в присутствии соляной кислоты при температуре 95°C до 8-гидроксихинолин-2-она (**46**) с выходом 93 %.

Синтезированный гидроксихинолин **46** ацилировали α -бромбутироилбромидом при соотношении реагентов 1:2 в присутствии хлористого алюминия в сероуглероде при кипячении и получали 2-бром-1-(8-гидроксихинолин-5-ил)бутан-1-он (**47**) с техническим выходом 75 %. Примесью оказался продукт двойного C^5-O^8 -ацилирования. Затем полученный бромкетон **47** вводили в реакцию с 10-кратным избытком изопропиламина в изопропанолу при температуре 30 °С, синтезировали 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-он (**48**) с выходом 90 %, который сразу же вводили в реакцию восстановления борогидридом натрия в среде метанола. Целевой продукт переводили в форму гидрохлорида **49** с выходом 70 %.

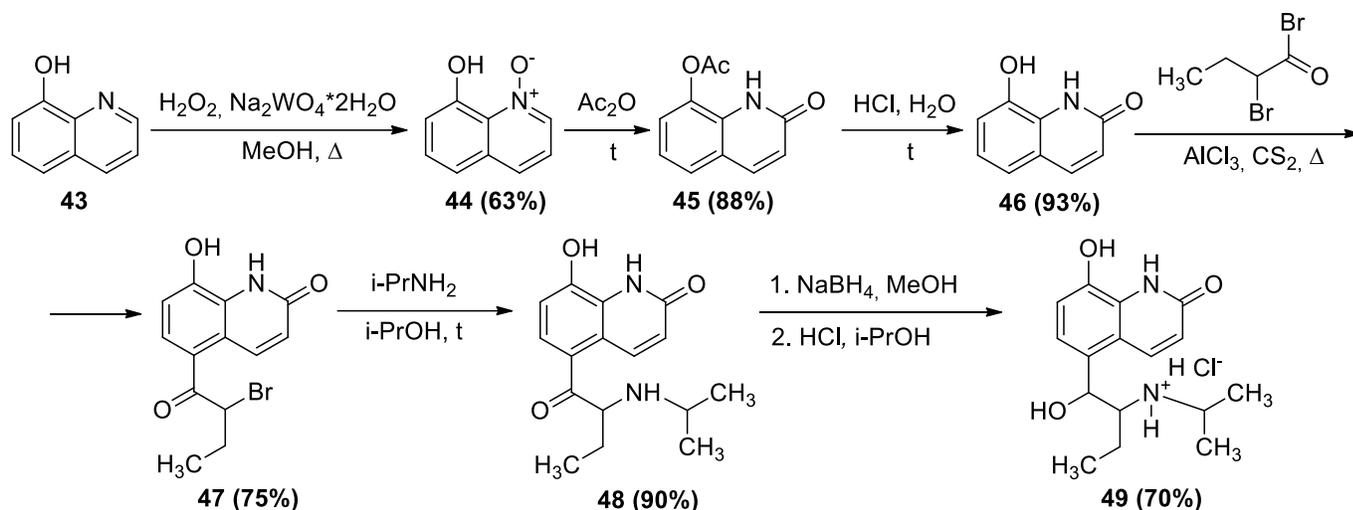


Рисунок 2.12 – Схема синтеза прокатерола (**49**)

2.1.12 Синтез изоксуприна

Для получения изоксуприна (**58**) за основу был взят способ, предложенный голландскими учеными (раздел 1.2.12) [98]. Препарат получали по восьмистадийной схеме (рисунок 2.13). Вначале по четырехстадийной схеме синтезировали одно из ключевых промежуточных соединений 1-фенокси-2-пропанамин (**53**). На первой стадии в результате хлорирования ацетона сульфурилхлоридом в хлористом метиле в присутствии метанола по способу, предложенному американскими исследователями [162], с выходом 39 % получали хлорацетон (**50**). Полученным хлорацетоном **50** в присутствии карбоната калия при катализе йодидом калия в ацетоне при кипячении алкилировали фенол при

соотношении реагентов 1:1 с образованием феноксиацетона (**51**) с выходом 75 %. Взаимодействие проводили аналогично китайскому патенту [163], добавляя для ускорения нуклеофильного замещения йодид калия в качестве катализатора в количестве 10 % мольн.

На следующей стадии феноксиацетон (**51**) конденсировали с гидросиламином при соотношении реагентов 1:1,5 в абсолютном спирте по методике [164], в результате чего получали оксим феноксиацетона (**52**) с выходом 89 % в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров в соотношении 76:24 (по данным ^1H ЯМР-спектроскопии).

Синтезированный оксим **52** восстанавливали водородом с использованием в качестве катализатора никеля Ренея при давлении водорода 5 атм и температуре 35 °С, аналогично методике мексиканских исследователей [165], получивших в этих же условиях такой же амин после перегонки под вакуумом с выходом 61 %. После гидрирования в течение 24 ч получали с количественным выходом (98 %) ключевой 1-фенокси-2-пропанамином (**53**), содержащий в качестве примеси 7 % изопропанола (по данным ^1H ЯМР-спектроскопии).

По второй цепи превращений вначале 4-гидроксипропиофенон (**54**) алкилировали бензилхлоридом при соотношении реагентов 1:1,5 в присутствии карбоната калия в условиях межфазного катализа ТЭБАХ в кипящем ацетонитриле с образованием промежуточного 4-бензилоксипропиофенона (**55**) с выходом 86 %. В результате его бромирования молекулярным бромом при соотношении реагентов 1:1 в уксунной кислоте получали ключевой 4-бензилокси-2'-бромпропиофенон (**56**), выход которого после очистки методом колоночной хроматографии составил 71 %.

Конденсацию бромпропиофенона **56** с 1-фенокси-2-пропанамином (**53**) при соотношении реагентов 1:1 в присутствии триэтиламина в качестве акцептора бромистого водорода проводили в кипящем изопропаноле. При этом выход технического 1-[4-(бензилокси)фенил]-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)-пропан-1-она (**57**) составил 90 %. После его очистки от примесей методом колоночной хроматографии получили аминокетон **57** с выходом 47 %. Последующее его гидрирование водородом при 2 атм при комнатной температуре в присутствии 10 %-ного палладиевого катализатора сопровождалось как *O*-дебензилированием, так и восстановлением кето-группы до спиртовой. Изоксуприн (**58**) после дополнительной очистки был получен с выходом 20 %.

Стоит отметить, что изокусуприн содержит 3 оптических центра и таким образом может существовать в виде 8 изомеров и 4 пар энантиомеров. Судя по температуре плавления образца (т. пл. 216-218 °С) он в основном представляет собой гидрохлорид *эритро*-изомера изокусуприна (ср. лит. т. пл. 202-203 °С [99]).

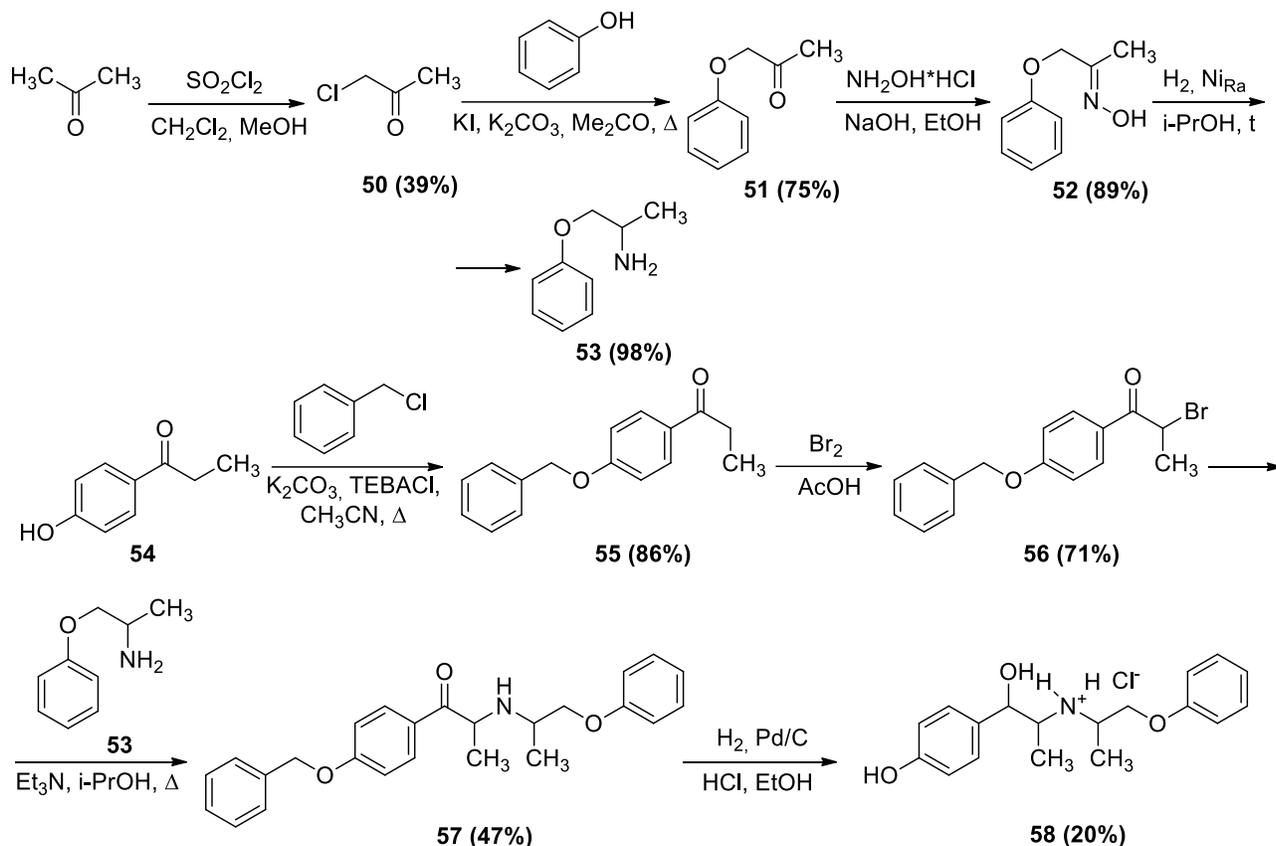


Рисунок 2.13 – Схема синтеза изокусуприна (58)

2.1.13 Синтез хигенамина

Из обзора литературы по методам получения хигенамина (64) (раздел 1.1.13) следует, что самый простой одностадийный способ синтеза может быть проведен двумя альтернативными путями: синтетически с первоначальной конденсацией 4-гидроксифенилацетальдегида с дофамином [108, 109], либо ферментативно катализируемой циклоконденсацией 4-гидроксифенилацетальдегида и дофамина в присутствии фермента NCS [109, 110].

Изначально для синтеза хигенамина (**64**) был опробован одностадийный способ, заключающийся в конденсации дофамина с 4-гидроксифенилацетальдегидом по реакции Пикте-Шпенглера (рисунок 2.14) [108]. Условия, в которой проводилась реакция: 1 экв. амина, 1,2 экв. альдегида; растворитель – ацетонитрил / 0,1 М буферный раствор с pH=6 (1:1, об.), температура реакции – 50 °С; время реакции – 12 ч. Но, несмотря на двукратное повторение, выделить из многокомпонентной реакционной массы хотя бы малые количества целевого продукта методом колоночной хроматографии не удалось.

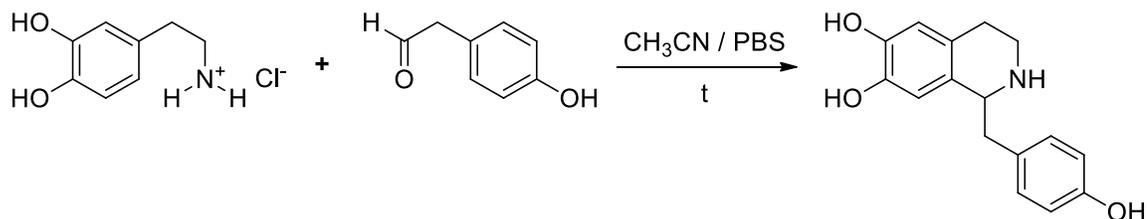


Рисунок 2.14 – Опробованная схема синтеза хигенамина (**64**) по реакции Пикте-Шпенглера

В связи с этим, основываясь на литературные источники [107, 111, 112], была разработана четырехстадийная схема синтеза хигенамина (**64**) (рисунок 2.15), являющаяся обобщением методик описанных в литературе. На первой стадии в результате реакции конденсации коммерчески доступных 2-(3,4-диметоксифенил)этиламина (**59**) и 4-метоксифенилуксусной кислоты (**60**) при соотношении реагентов 1:1, проводимой в присутствии двукратного избытка триэтиламина и O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуридий тетрафторбората в среде хлористого метилена, получали после очистки методом колоночной хроматографии ацетамид **61** с выходом 89 %. Затем в результате циклизации N-[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-2-(4-метоксифенил)ацетамида (**61**) с использованием хлорокси фосфора с выходом 97 % синтезировали технический дигидроизохинолин **62**, который без дополнительной очистки восстанавливали борогидридом натрия с получением тетрагидроизохинолина **63** с почти количественным выходом 96 % после очистки методом колоночной хроматографии. На заключительной стадии синтеза метоксигруппы снимали действием трибромида брома, использованном в шестикратном избытке, при температуре 0 °С в хлористом метиле. В результате реакции получили свободный хигенамин, который очищали методом полупрепаративной жидкостной хроматографии и переводили в форму гидрохлорида **64**. Выход конечного

продукта **64** составил 68 %. Суммарный выход хигенамина (**64**) на четыре стадии синтеза составил 56 %.

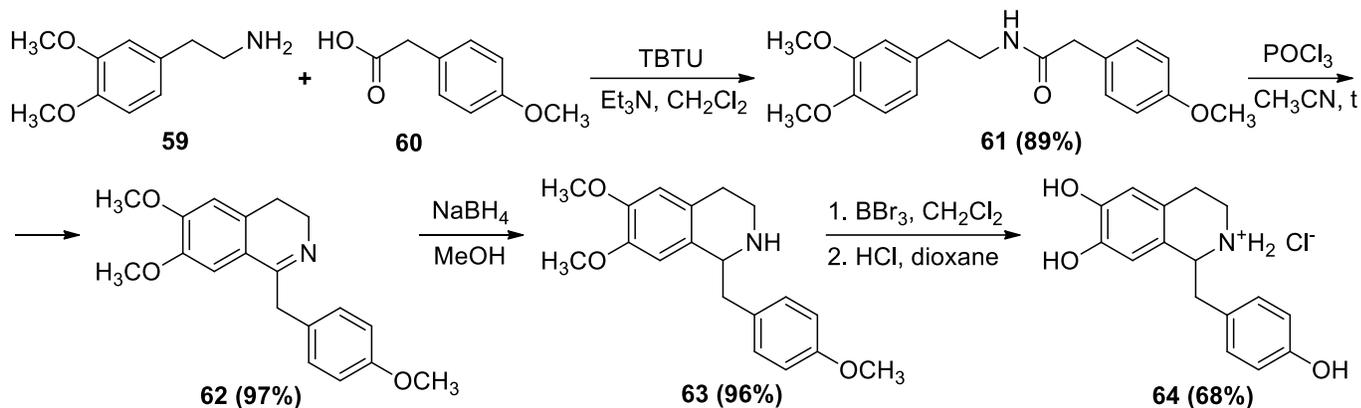


Рисунок 2.15 – Схема синтеза хигенамина (**64**)

2.2 Синтез агонистов β_2 -адренорецепторов со структурой 2-амино-2-арилэтанолов

В данном разделе рассмотрены способы получения изомерных по положению гидроксигрупп и аминогрупп в фенилэтановом остове аналогов кленпроперола (**5а**), кленпентерола (**5в**), циматерола (**21а**), мабутерола и мапентерола со структурой 2-амино-2-арилэтанолов. Ключевыми стадиями синтеза данных соединений являются восстановление замещенных бромацетофенонов и последующее алкилирование полученными бромгидринами аминов. Взаимодействие бромгидринов с алкиламинами проводили в безводных условиях, используя в качестве растворителя безводный этанол или толуол. В данных условиях реакция идет через образование оксирана, последующее раскрытие цикла которого происходит против правила Красуского.

2.2.1 Синтез 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов, изомерных аналогов кленпроперола и кленпентерола

Для синтеза 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(изопропиламино)этанола (**66а**) и 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанола (**66б**), являющихся веществами изомерными кленпроперолу (**5а**) и кленпентеролу (**5в**), соответственно, была

разработана четырехстадийная схема синтеза с использованием 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (**3**) (рисунок 2.16). При измененном по сравнению со схемой получения кленбутерола (**5б**) (рисунок 2.1) порядке превращений на первой стадии бромацетофенон (**3**) восстанавливали борогидридом натрия в среде метанола до бромгидрина **65** с выходом продукта 94 %. Полученным бромгидрином **65** алкилировали соответствующие амины при соотношении реагентов 1:5 в абсолютном этиловом спирте при комнатной температуре. Конечные продукты очищали методом колоночной хроматографии и переводили в форму гидрохлоридов **66а,б**. Выход изомерного аналога кленпроперола (**66а**) составил 53 %, изомерного аналога кленпентерола (**66б**) – 31 %.

Необходимый для данных превращений 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенон (**3**) был получен в результате хлорирования 4-аминоацетофенона (**1**) хлором с последующим бромированием продукта хлорирования **2**, как и в случае синтеза кленпроперола (**5а**), кленбутерола (**5б**) и кленпентерола (**5в**) (рисунок 8).

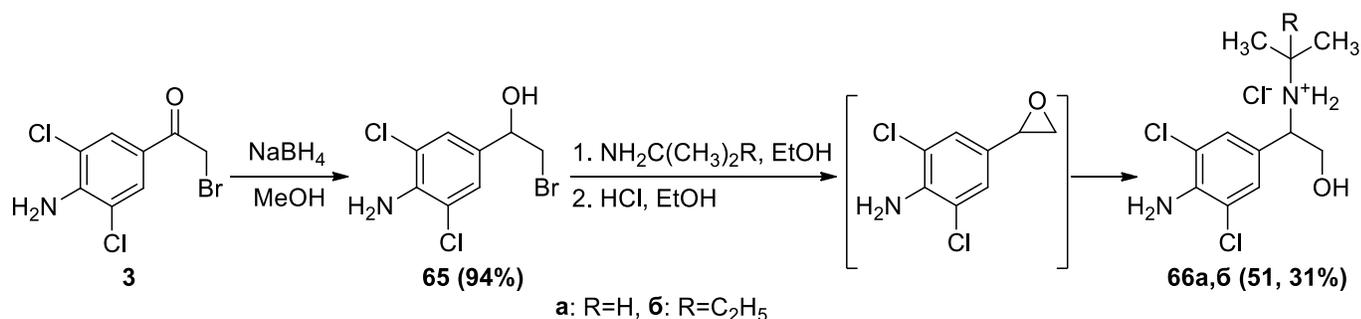


Рисунок 2.16 – Схема синтеза 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов (**66а,б**)

Структуры целевых соединений **66а,б** подтверждены данными ГХ-МС: в масс-спектрах соединений присутствовали ионы с $m/z = 231.0$ (для **66а**) и 259.0 (для **66б**), соответствующие фрагментам молекулы с отщепленной гидроксиметильной группой. Также в спектрах обоих соединений присутствовал ион с $m/z = 189.0$, соответствующий фрагментам молекулы с отщепленными гидроксиметильной и N-алкильной группами.

В статье [114] описаны условия реакции синтеза 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-изопропиламиноэтанола (**66а**) из бромгидрина **65** с выходом продукта 7,5 %. Авторы статьи проводили данную реакцию в кипящем абсолютном этаноле. В результате

алкилирования при комнатной температуре в течение ночи удалось получить 2-амино-2-этанол **66a** с большим выходом 51 %.

2-(4-Амино-3,5-дихлорфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанол (**66b**) синтезировали впервые.

2.2.2 Синтез 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола, изомерного аналога циматерола

Основываясь на литературные данные (раздел 1.3) [113], для получения 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**), являющегося изомерным аналогом циматерола (**21a**), реализована пятистадийная схема синтеза (рисунок 2.17). Одной из ключевых стадий процесса стало восстановление кето-группы до спиртой в 4-амино-3-циано-2'-бромацетофеноне (**20**) действием борогидрида натрия в среде метанола. Выход продукта **67** после очистки методом колоночной хроматографии составил 75 %. На следующем этапе полученным бромгидрином **67** алкилировали изопропиламин при соотношении реагентов 1:5. Как и в аналогичных случаях получения β_2 -агонистов со структурой 2-амино-2-арилэтанолов образование конечного продукта **68** происходило через образование промежуточного оксирана. Данную реакцию проводили в присутствии абсолютного этанола при комнатной температуре. Ключевое соединение очищали методом градиентной колоночной хроматографии и переводили в форму гидрохлорида **68** с выходом 50 %.

Необходимый для данных превращений 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенон **20** получали по трехстадийной схеме, аналогичной схеме синтеза циматерола (**21a**) и цимбутерола (**22b**) (рисунок 2.5).

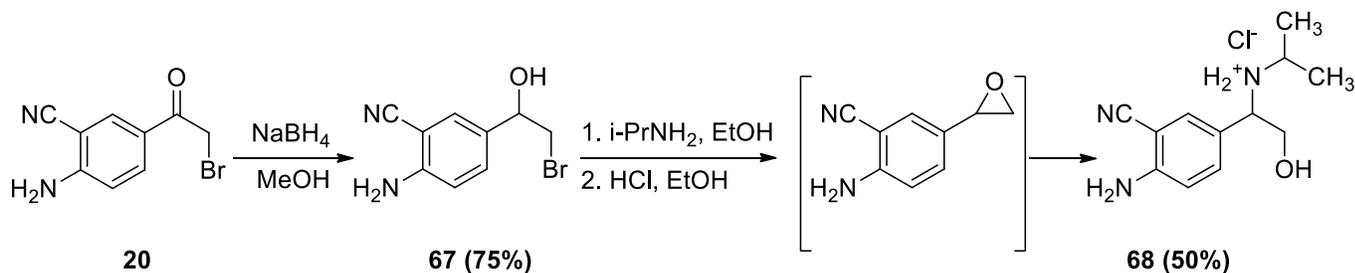


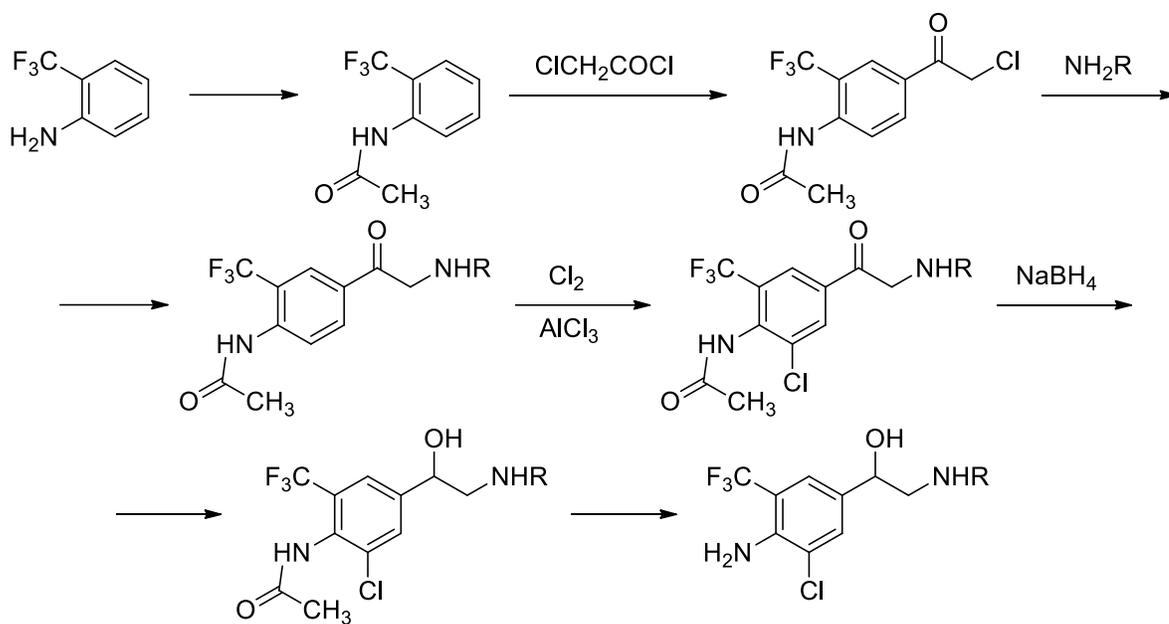
Рисунок 2.17 – Схема синтеза 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**)

Структура синтезированного 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**) подтверждена методом ГХ-МС. В масс-спектре соединения присутствовали ион с $m/z = 188.1$, соответствующий фрагменту молекулы с отщепленной гидроксиметильной группой, и ион с $m/z = 146.0$, соответствующий фрагменту молекулы с отщепленными гидроксиметильной и N-изопропильной группами.

В патенте [113] описан синтез 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**), однако нет данных о выходе продукта. Аналогичные соединения авторы патента получали с выходом до 20 % в кипящем абсолютном этаноле. Выход целевого соединения **68** удалось увеличить до 50 % при проведении реакции алкилирования изопропиламина бромгидрином **67** при комнатной температуре при перемешивании в течение 60 ч.

2.2.3 Синтез 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(алкиламино)этанолов, изомерных аналогов мабутерола и мапентерола

Как уже было сказано ранее, изомерный аналог мабутерола – 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанол (**78a**) – проявляет значительную селективную β_2 -агонистическую активность, доказанную в ходе доклинических исследований. Данное соединение получило название трантинтерол или SPFF. При поиске методов синтеза веществ, изомерных мабутеролу (**78a**) и мапентеролу (**78б**), была найдена достаточно подробно описанная пятистадийная схема получения трантинтерола (**78a**) (раздел 1.3) [113]. Сложность реализации синтеза по данной схеме с учетом необходимости получения исходной 4-амино-3-хлор-5-трифторметилбензойной кислоты послужила основанием для изучения возможности получения соединений **78a,б** новым способом с использованием реакции ацилирования ароматического цикла хлорацетилхлоридом (рисунок 2.18).



a: R=C(CH₃)₃, б: R=C(CH₃)₂C₂H₅

Рисунок 2.18 – Предложенная схема синтеза 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*tert*-бутиламино)этанола (**78a**) и 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*tert*-пентиламино)этанола (**78б**)

Аналогичная схема синтеза была описана в литературе [27] для синтеза циматерола (**21a**), однако, в данном случае провести ацилирование ацетильного производного 2-трифторметиланилина не удалось. В соответствии с этим, основное внимание было уделено усовершенствованию схемы получения трантинтерола (**78a**), описанной в литературе [113].

Согласно разработанному способу на первой стадии 2-трифторметиланилин (**69**) обрабатывали двукратным избытком йода с образованием 4-йодпроизводного **70** с выходом 73 % (рисунок 2.19). Затем в йоданилине **70** атом йода замещали на цианогруппу действием цианида меди при соотношении реагентов 1:1,8 в кипящем ДМФА с выходом замещенного бензонитрила **71** 40 %. На следующем этапе полученный 4-амино-3-трифторметилбензонитрил (**71**) подвергали щелочному гидролизу. Выход 4-амино-3-трифторметилбензойной кислоты (**72**) составил 80 %. Затем с выходом 50 % получали хлорпроизводное **73** в результате реакции кислоты **72** с сульфурилхлоридом при соотношении реагентов 1:1,3, проводимой при кипячении в среде дихлорэтана. Полученную замещенную бензойную кислоту **73** обрабатывали тионилхлоридом с образованием 4-амино-3-хлор-5-трифторметилбензоил хлорида (**74**) с выходом 80 %. На

следующей стадии, согласно методике [113], в результате реакции бензоилхлорида **74** с магниевым производным диэтилового эфира малоновой кислоты при соотношении реагентов 1:1 с последующим гидролизом продукта ацилирования в присутствии серной кислоты с выходом 46 % получали ацетофенон **75**. Его бромирование молекулярным бромом привело к α -бромпроизводному **76** с выходом 50 %. Последующее восстановление α -бромацетофенона **76** борогидридом натрия до соответствующего спирта сопровождалось элиминированием бромоводорода в щелочной среде и привело к оксирану **77** с выходом 27 %. На конечном этапе полученным оксираном алкилировали соответствующие амины при соотношении реагентов 1:2,5 в среде толуола. Синтезированные целевые 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанол и 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанол переводили в форму гидрохлоридов **78а,б** с выходами на заключительных стадиях 25 % и 27 %, соответственно.

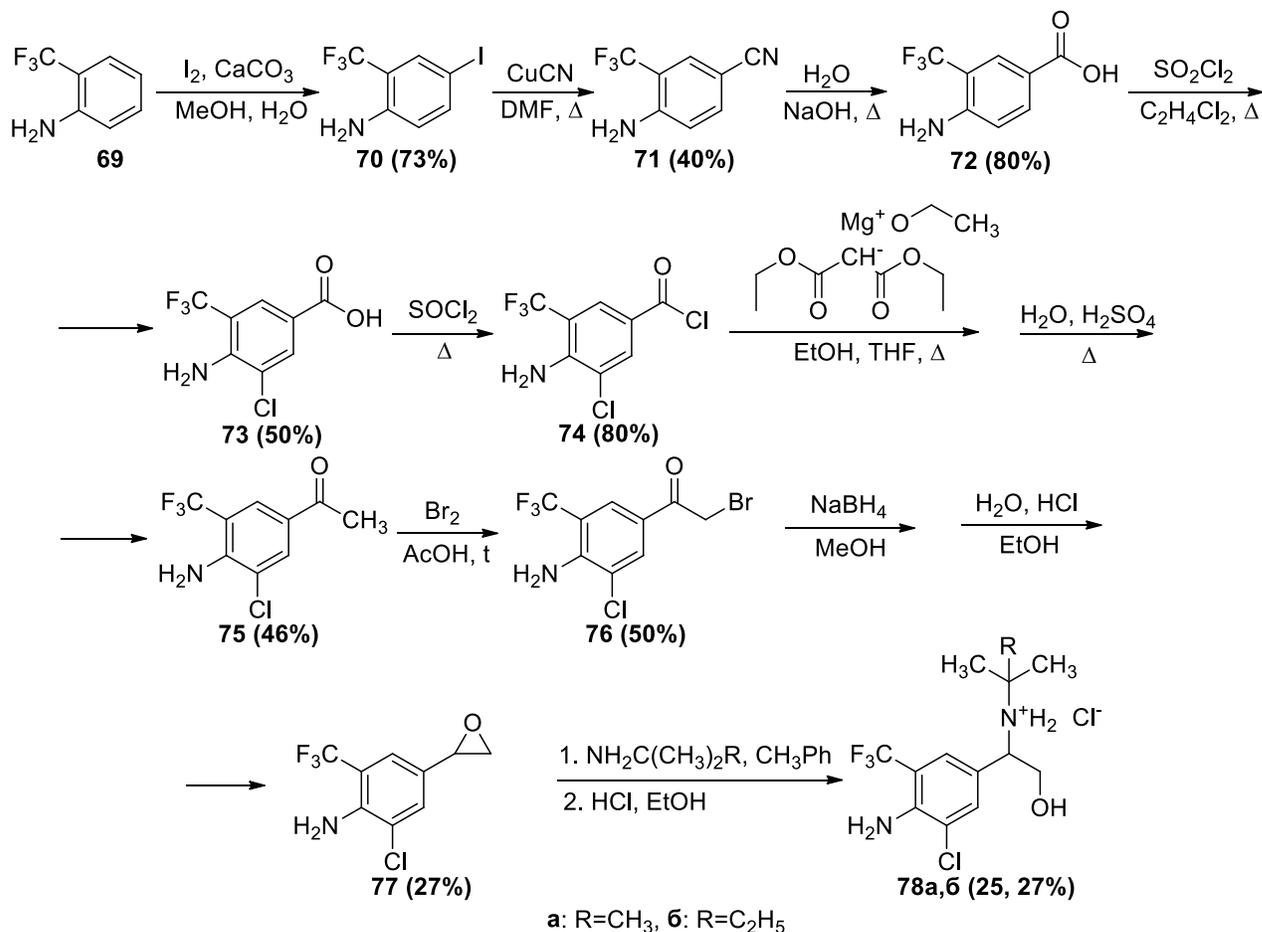


Рисунок 2.19 – Схема синтеза 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(алкиламино)этанолов (**78а,б**)

Подтверждение α -положения гидроксигруппы и β -положения аминогруппы было дано методом хромато-масс-спектрометрии. В спектре ГХ-МС присутствовали пики с $m/z = 279.0$ (для **78a**) и $m/z = 293.0$ (для **78б**), соответствующие фрагментам молекулы с отщепленной гидроксиметильной группой и с $m/z = 223.0$, соответствующий фрагментам молекулы с отщепленной гидроксиметильной и N-алкильной группами.

2-(4-Амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанол (**78б**) синтезировали впервые.

2.3 Синтез метаболитов

2.3.1 Синтез 4-амино-3,5-дигалогенминдальных кислот, метаболитов бромбутерола и кленбутерола

Известно, что метаболические превращения галогенсодержащих β_2 -агонистов кленбутерола (**5б**) (кленпроперола (**5a**), кленпентерола (**5в**)) и бромбутерола (**8**) в первую очередь протекают путем расщепления боковой цепи молекулы с образованием 4-амино-3,5-дигалогенминдальных кислот (**80a,б**) (раздел 1.4.1) [10, 117-119]. Синтез миндальных кислот с интересующей нас структурой в литературе не описан. Ранее данные соединения были охарактеризованы только методом жидкостной хроматографии при изучении метаболизма кленбутерола (**5б**) и бромбутерола (**8**) [117-119].

Обзор литературы показывает, что наиболее часто для получения миндальных кислот используют способ, основанный на взаимодействии альдегидов с синильной кислотой, за которым следует гидролиз нитрильной группы циангидрина до карбоксильной (рисунок 2.20) [166, 167]. Данный метод широко представлен в литературе, реакции идут с хорошими выходами. Только два недостатка могут вносить ограничение на его применение: высокая токсичность используемой синильной кислоты или ее солей и недоступность какого-либо бензальдегида, используемого в синтезе замещенной фенилгидроксиуксусной кислоты.

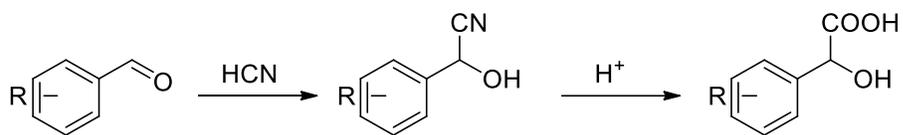


Рисунок 2.20 – Способ получения миндальных кислот с использованием синильной кислоты

Другой способ получения миндальных кислот, в котором также используется в качестве исходного продукта замещенный бензальдегид, состоит во взаимодействии этого альдегида с дигалогенкарбеном, который образуется *in situ* из хлороформа или бромформа в присутствии щелочей (рисунок 2.21) [168-170]. Достоинство метода, по сравнению с представленным выше, - исключение из реакции токсичных цианидов. Вместе с тем, метод пригоден не во всех случаях. Ограничение, как и в предыдущем варианте, может быть связано с недоступностью исходного замещенного бензальдегида. Кроме того, образование в процессе реакции высокореакционного дигалогенкарбена исключает применение в качестве исходных соединений, которые содержат, например, аминогруппу, поскольку последняя в таких условиях превращается в изонитрил.

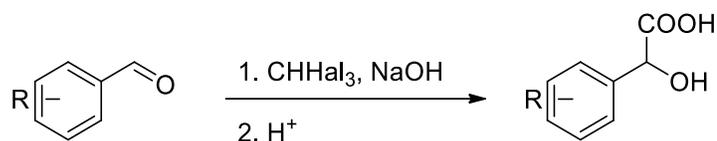


Рисунок 2.21 – Способ получения миндальных кислот с использованием дигалогенкарбена

Следующая группа методов получения миндальных кислот, также широко представленная в литературе, основана на введении гидроксигруппы в фенилуксусные кислоты посредством окислителей, таких как тетраацетат свинца или окислением литиевой соли кислородом воздуха (рисунок 2.22) [171]. Недостатки метода обусловлены ограниченным набором коммерчески доступных замещенных фенилуксусных кислот, синтез которых, как правило, представляет собой многостадийный процесс. Кроме того, применение тетраацетата свинца или литийорганических реагентов накладывает дополнительные ограничения на применимость метода, поскольку многофункциональные группы вступают во взаимодействие с данными реагентами.

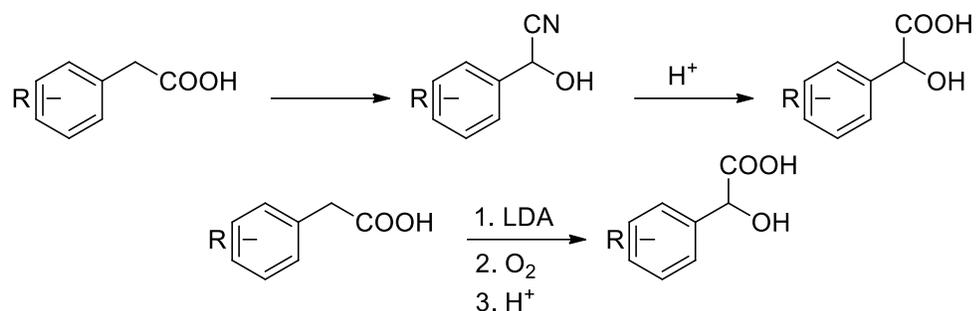


Рисунок 2.22 – Способ получения миндальных кислот с использованием окислителей

Еще одним широко используемым методом получения миндальных кислот, который может быть использован для синтеза этих соединений с различными заместителями, является щелочной гидролиз дигалогенацетофенонов, сопровождаемый таутомеризацией продуктов гидролиза (рисунок 2.23) [172, 173]. Взаимодействие, как правило, идет с хорошими выходами. Недостатки и ограничения метода состоят лишь в том, что, так как реакцию проводят в водном растворе щелочи, в случае получения миндальных кислот, содержащих гидрофильные фрагменты, выделение продукта из реакционной массы может представлять значительные трудности. Другое ограничение метода связано с доступностью дигалогенкетона. Как известно, такие соединения получают путем последовательного галогенирования соответствующих ацетофенонов. Не во всех случаях возможно прямое галогенирование в α -положение. Так, например, если в ядре кетона присутствуют ярко выраженные донорные группы, то наряду с α -галогенированием будет происходить введение галогена в ароматический цикл с получением продуктов электрофильного замещения. В итоге будет получаться галогензамещенная в ядро миндальная кислота.

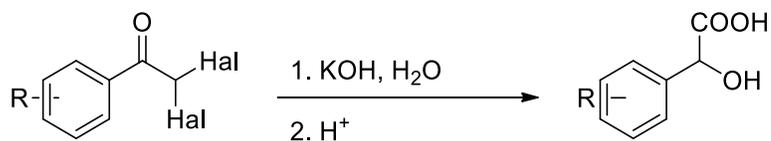


Рисунок 2.23 – Способ получения миндальных кислот, основанный на щелочном гидролизе дигалогенацетофенонов

Для получения 4-амино-3,5-дибромминдальной кислоты (**80a**) (метаболита бромбутерола (**8**)) и 4-амино-3,5-дихлорминдальной кислоты (**80b**) (метаболита кленбутерола (**5b**)), кленпроперола (**5a**) и кленпентерола (**5в**)) был выбран широко используемый способ аналогично [172, 173], основанный на щелочном гидролизе дигалогенацетофенонов **79** и **81**, сопровождаемый таутомеризацией продуктов гидролиза

(рисунки 2.24, 2.25). Реакцию проводили с использованием водного раствора гидроксида калия при температуре 60 °С с дальнейшим ее повышением до 90 °С. Выход 4-амино-3,5-дибромминдальной кислоты (**80a**) после перекристаллизации составил 26 %, выход 4-амино-3,5-дихлорминдальной кислоты (**80б**) после очистки методом градиентной колоночной хроматографии – 28 %. Необходимый для получения метаболита **80a** тетрабромацетофенон **79** с выходом 35 % получали бромированием 4-аминоацетофенона (**1**) четырехкратным избытком брома в среде уксусной кислоты при комнатной температуре, а необходимый для синтеза метаболита **80б** дибромдихлорацетофенон **81** – обработкой 4-аминоацетофенона (**1**) двумя эквивалентами хлора (выход продукта **2** – 36 %) (раздел 2.1.1) с последующим бромированием продукта хлорирования **2** в эквимольном соотношении при температуре 60 °С в среде уксусной кислоты. Выход дибромдихлорацетофенона **81** составил 61 %.

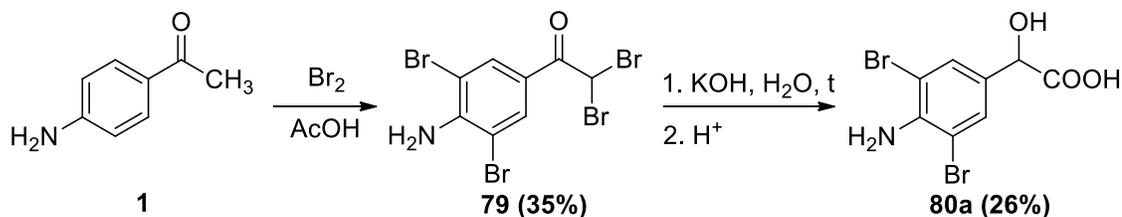


Рисунок 2.24 – Схема синтеза 4-амино-3,5-дибромминдальной кислоты (**80a**)

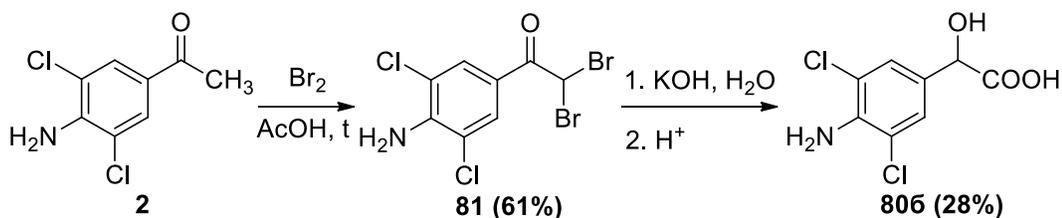


Рисунок 2.25 – Схема синтеза 4-амино-3,5-дихлорминдальной кислоты (**80б**)

2.3.2 Синтез 4-амино-3,5-дигалогенгиппуровых кислот, метаболитов бромбутерола и кленбутерола

4-Амино-3,5-дигалогенгиппуровые кислоты (**85a,б**) также являются основными метаболитами кленбутерола (**5б**) (кленпроперола (**5a**), кленпентерола (**5в**)) и бромбутерола (**8**). Данные метаболиты являются продуктами окислительного расщепления боковой цепи молекулы, образующиеся в результате взаимодействия 4-амино-3,5-дихлорбензойной

кислоты с глицином (раздел 1.4.2). Как и в случае миндальных кислот **80a,б** гиппуровые кислоты **85a,б**, согласно литературным данным, были охарактеризованы только методом жидкостной хроматографии при изучении метаболизма кленбутерола (**56**) и бромбутерола (**8**) [117-119], методы их получения в литературе не описаны.

Литературные данные насчитывают сотни источников, в которых описаны варианты синтеза различных гиппуровых кислот. По этой причине далее будут рассмотрены основные способы получения данных соединений.

Наиболее часто применяемый метод получения бензоиламиноуксусных кислот заключается в прямом ацилировании глицина бензоилхлоридами по реакции Шоттена-Баумана, которое проводят в водном растворе щелочи или карбонатов щелочных металлов – акцепторов образующегося хлороводорода (рисунок 2.26) [174-176].

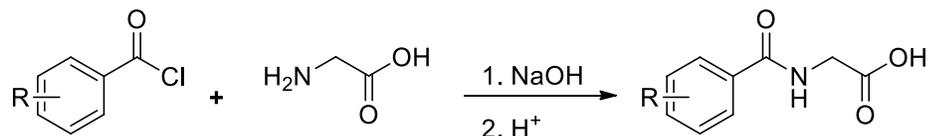


Рисунок 2.26 – Способ получения гиппуровых кислот по реакции Шоттена-Баумана

Несмотря на то, что реакция идет в мягких условиях и процесс хорошо изучен, он имеет ряд ограничений. Во-первых, проведение взаимодействия в водной среде приводит к тому, что не весь бензоилхлорид превращается в целевую гиппуровую кислоту. Наряду с ацилированием наблюдается гидролиз хлорангидридов.

Другим побочным процессом, сопутствующим ацилированию в условиях реакции Шоттена-Баумана, является образование смешанных ангидридов, в дальнейшем выступающих в качестве ацилирующих агентов (рисунок 2.27). Продукт ацилирования дипептид также может далее ацилироваться хлорангидридом с образованием примеси.

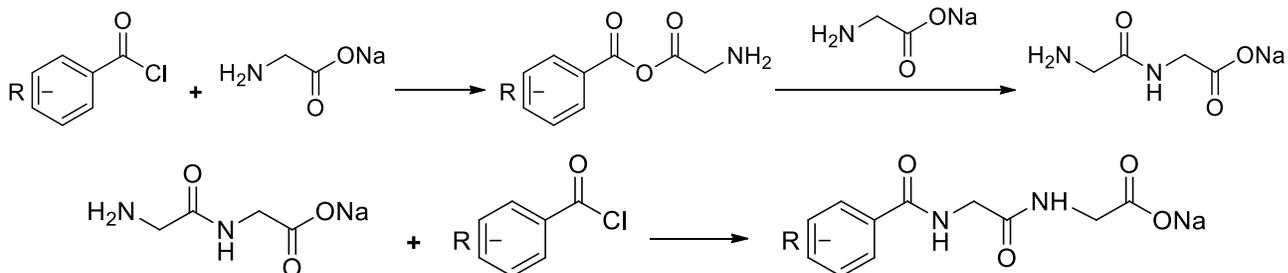


Рисунок 2.27 – Побочные продукты в условиях реакции Шоттена-Баумана

Таким образом, в реакционной массе содержатся примеси, которые имеют кислотные функции, как и продукт, и, как правило, сходные физико-химические свойства (нерастворимость в органических растворителях, плохая подвижность на хроматографической колонке), что сильно затрудняет очистку целевого продукта. Другой недостаток метода состоит в том, что побочный гидролиз бензоилхлорида в некоторых случаях является основным процессом. Это обусловлено реакционной способностью данного бензоилхлорида и величиной его гидрофильности.

В результате, в некоторых случаях продукт либо сильно загрязнен побочными продуктами, либо вообще не получается в силу превалирующего гидролиза. В связи с этим, иногда ацилирование проводят в среде пиридина, как растворителя и одновременно акцептора хлороводорода. Это исключает гидролиз хлорангидрида, но повышает количество побочных продуктов, обусловленных образованием смешанных ангидридов.

Представленные выше недостатки ацилирования аминокислот в водно-щелочной среде и в среде пиридина исключаются заменой одного из исходных реагентов при ацилировании сложных эфиров аминокислот в неводной среде (рисунок 2.28). Данное взаимодействие проводят, как правило, в среде хлороформа, хлористого метилена или ацетонитрила при использовании триэтиламина в качестве акцептора хлороводорода. Полученный эфир гиппуровой кислоты в силу своей растворимости в органических растворителях может быть легко выделен и очищен. Дальнейший щелочной гидролиз эфира позволяет выделить гиппуровую кислоту.

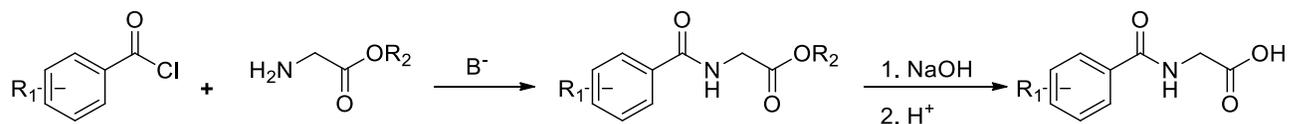


Рисунок 2.28 – Способ получения гиппуровых кислот по модифицированной реакции Шоттена-Баумана

Из всех остальных методов синтеза гиппуровых кислот, единственный, который заслуживает внимание на наш взгляд, поскольку является универсальным с точки зрения получения различных замещенных бензоиламиноацетатов, представлен взаимодействием бензамида с формальдегидом в присутствии монооксида углерода (рисунок 2.29). Реакция

проводится в присутствии комплексов солей кобальта с монооксидом углерода и наиболее хорошо представлена в работе Штерна с сотрудниками [177].

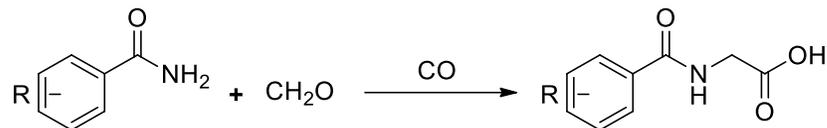


Рисунок 2.29 – Способ получения гипсуровых кислот по Штерну

В связи с этим для синтеза 4-амино-3,5-дигалогенгипсуровых кислот **85a,б** разработали трехстадийную схему синтеза с использованием доступных реагентов (рисунок 2.30). За основу была взята модифицированная реакция Шоттена-Баумана, используемая для получения гипсуровых кислот с различными заместителями [174-176].

Согласно разработанной схеме на первой стадии проводили галогенирование 4-аминобензойной кислоты (**82**) в среде уксусной при комнатной температуре. По данным ПМР наряду с дигалогензамещенными продуктами **83a,б** в ходе реакции образуются монозамещенные производные, которые удаляли перекристаллизацией. Выход бромпроизводного **83a** составил 66 %, а хлорпроизводного **83б** – 32 %. Затем полученные кислоты **83a,б** с использованием эквимолярного количества тионилхлорида в хлороформе в присутствии ДМФА при кипячении перевели в соответствующие бензоилхлориды, которыми без выделения из реакционной массы «one pot» ацилировали этиловый эфир глицина в присутствии триэтиламина при комнатной температуре. Выходы эфиров **84a,б** составили 29 % и 55 %, соответственно. Ключевые кислоты **85a,б** с выходами 49 % и 77 % получали в результате щелочного гидролиза эфиров гипсуровой кислоты **84a,б** раствором гидроксида калия в метаноле.

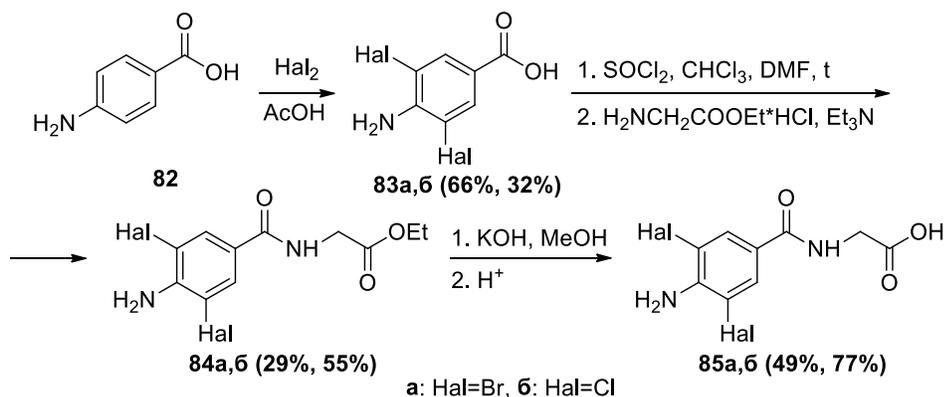


Рисунок 2.30 – Схема синтеза 4-амино-3,5-дигалогенгипсуровых кислот (**85a,б**)

2.3.3 Синтез (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты, метаболита вилантерола

Процессы O-, N-, C-деалкилирования являются основными путями метаболизма вилантерола в организме людей и животных (раздел 1.4.3) [125, 126]. Для синтеза из всех возможных метаболитов вилантерола был выбран N-алкилглицин **90**, являющийся продуктом C-деалкилирования и охарактеризованный данными хромато-масс-спектрометрии. Методы синтеза (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**90**) в литературе не описаны.

Для синтеза гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**90**) предложили четырехстадийный метод получения (рисунок 2.31). На первой стадии в результате конденсации 2,6-дихлорбензилхлорида (**86**) с этиленгликолем при кипячении синтезировали 2-(2,6-дихлорбензилокси)этанол (**87**) с выходом 74 %. На следующей стадии спирт **87** алкилировали 1,6-дибромгексаном. Для снижения образования продукта бис-алкилирования использовали шестикратный мольный избыток дибромгексана. В результате получили многокомпонентную смесь, из которой бромид **88** выделили лишь с выходом 9 %. Далее проводили алкилирование этилового эфира глицина в среде ДМФА при эквимольном соотношении реагентов.

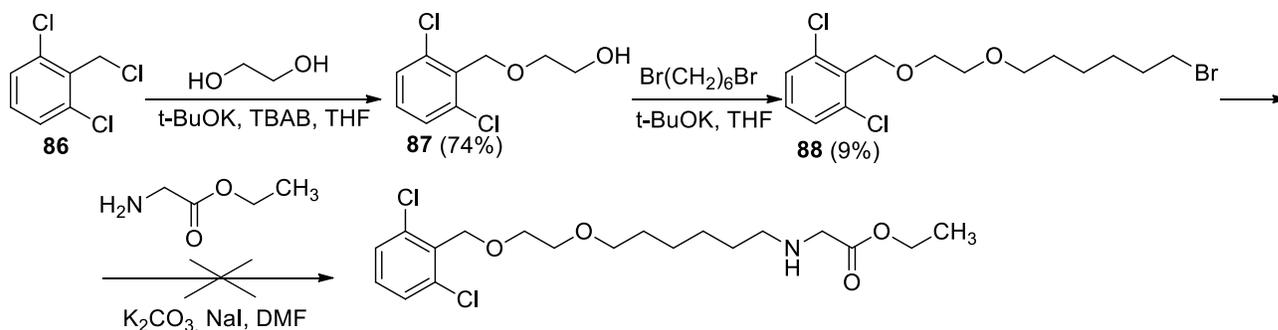


Рисунок 2.31 – Предложенная схема синтеза (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**90**)

По данным хромато-масс-спектрометрии в реакционной массе были обнаружены как целевой продукт, так и продукты бис-алкилирования и бис-ацилирования (рисунок 2.32).

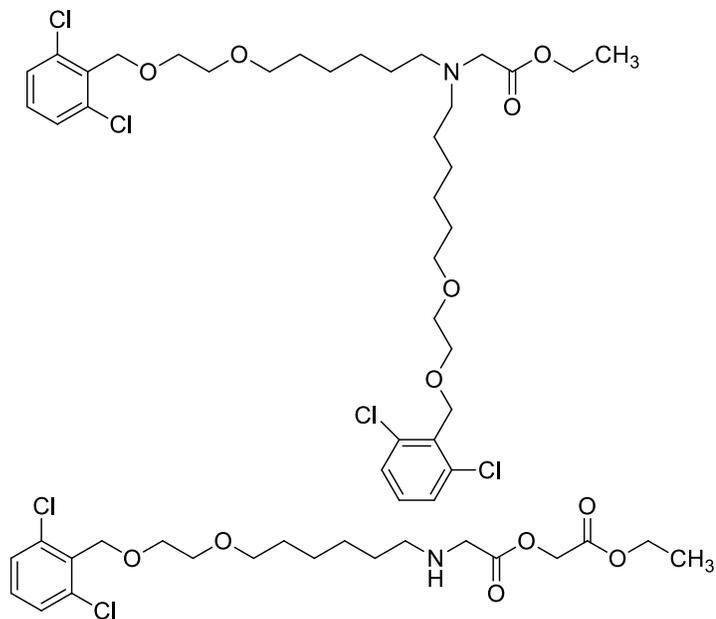


Рисунок 2.32 – Структуры побочных продуктов, полученных в результате алкилирования этилового эфира глицина

Отделение продукта ацилирования представлялось сложной задачей, поскольку на хроматограммах время удерживания этого компонента совпадало с времени удерживания целевого продукта. На последней стадии было предложено гидролизовать этиловый эфир (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты разбавленной соляной кислотой. Кислотный гидролиз позволил бы разрушить не только сложноэфирную, но и амидную связь побочного неотделимого продукта.

Однако в результате 6-часового кипячения было обнаружено, что целевая кислота не образуется. На хромато-масс-спектре отсутствовал пик, характерный для продукта, а согласно данным спектра ^1H ЯМР-спектроскопии выделенное вещество не содержало ароматических фрагментов, что обусловлено гидролизом простого эфира и отщеплением бензильного фрагмента молекулы.

Поскольку рассмотренная схема не привела к положительному результату, был опробован способ получения метаболита вилантерола (**90**) с применением *трет*-бутилового эфира глицина вместо этилового (рисунок 2.33). Как известно, *трет*-бутиловые эфиры не ацилируют аминогруппы, что позволяет избежать образования побочных продуктов ацилирования даже при использовании избытка эфира по отношению к алкилятору. При этом избыток *трет*-бутилового эфира глицина по отношению к

алкилятору позволяет снизить долю продукта *бис*-алкилирования. Дополнительным преимуществом *трет*-бутилового эфира глицина по сравнению с этиловым является объемность *трет*-бутильной группы, что дополнительно снижает вероятность *бис*-алкилирования. Кроме того, легкость кислотного гидролиза *трет*-бутиловых эфиров позволяет осуществить его в мягких условиях и исключить распад бензилового эфира.

Таким образом N-алкилирование *трет*-бутилового эфира глицина проводили в условиях, аналогичных алкилированию этилового, в среде ДМФА в присутствии карбоната калия при эквимольном соотношении реагентов. Выход продукта **89** составил 60 %. На последней стадии из эфира **89** обработкой хлороводородом в диоксане получали гидрохлорид (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**90**) с выходом 32 %.

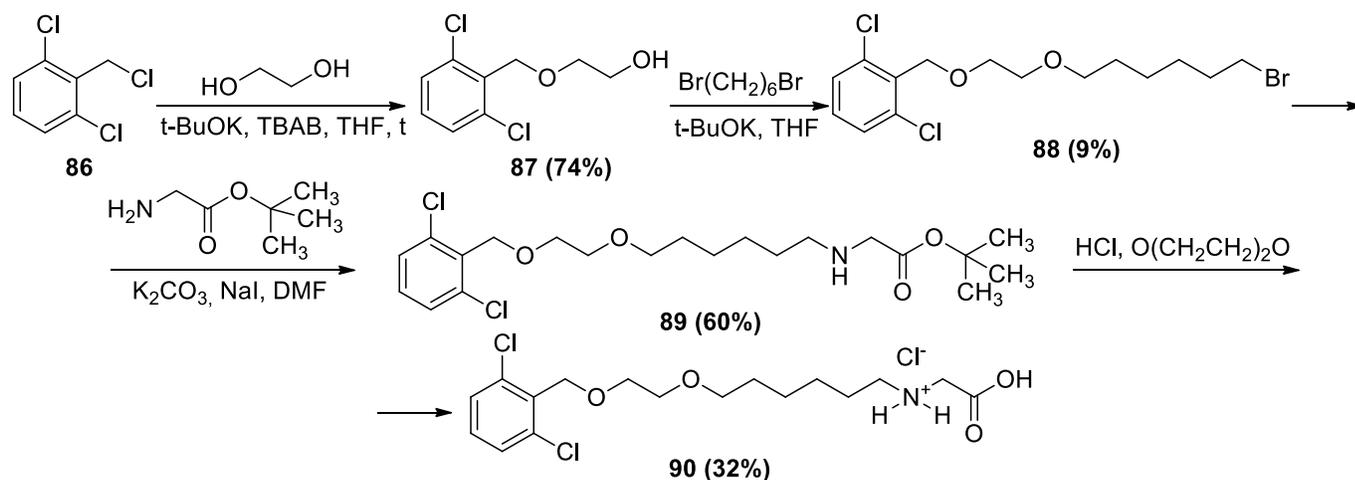


Рисунок 2.33 – Схема синтеза (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**90**)

Необходимый для данных превращений *трет*-бутиловый эфир глицина получали известным способом путем переэтерификации согласно методике [178]. (рисунок 2.34).

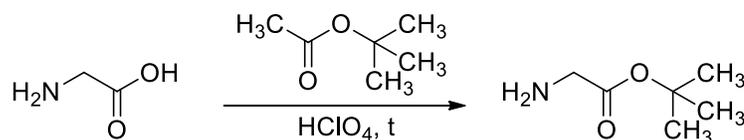


Рисунок 2.34 – Способ получения *трет*-бутилового эфира глицина

2.4 Исследование фармакокинетики бромбутерола и 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-алкиламиноэтанола

Следующим этапом работы было проведение фармакокинетических исследований для галоген-содержащих β_2 -агонистов бромбутерола (**8**) и 2-амино-2-арилэтанола **66a,b**, являющихся структурными изомерами кленбутерола (**5b**). Данные исследования играют большую роль при разработке лекарственных препаратов и оценки их влияния на людей и животных. Фармакокинетику изучали по динамике изменения концентрации β_2 -адреномиметиков в крови лабораторных животных. Помимо получения фармакокинетических параметров целевых соединений существует необходимость изучения их путей биотрансформации и определения метаболитов. Данный аспект также играет большую роль как для определения остаточных количеств агонистов β_2 -адренорецепторов в сельскохозяйственной продукции, так и для установления факта использования препаратов в сельскохозяйственных целях, поскольку в ряде случаев метаболиты идентифицируются в биологических средах более длительное время, чем поступающее в организм вещество. Контроль за метаболическими превращениями проводили по динамике экскреции исследуемых веществ и их метаболитов с мочой, поскольку данная биологическая жидкость является доступной, а ее состав наиболее информативен.

Известно, что метаболические превращения кленбутерола (**5b**) и бромбутерола (**8**), в первую очередь, протекают путем окислительного расщепления боковой цепи с образованием 4-амино-3,5-дигалогенминдальных кислот (**80a,b**) с их дальнейшей биотрансформацией, приводящей к образованию 4-амино-3,5-дигалогенгиппуровых кислот (**85a,b**) (раздел 1.4.1, раздел 1.4.2) [10, 117-119]. Мы предположили, что пути метаболизма 2-амино-2-арилэтанола **66a,b** и кленбутерола (**5b**) сходны и приводят к образованию одних и тех же метаболитов. Для оценки и контроля метаболических превращений целевых соединений **8**, **66a,b** выбрали синтезированные метаболиты **80a,b** и **85a,b** (рисунок 2.35).

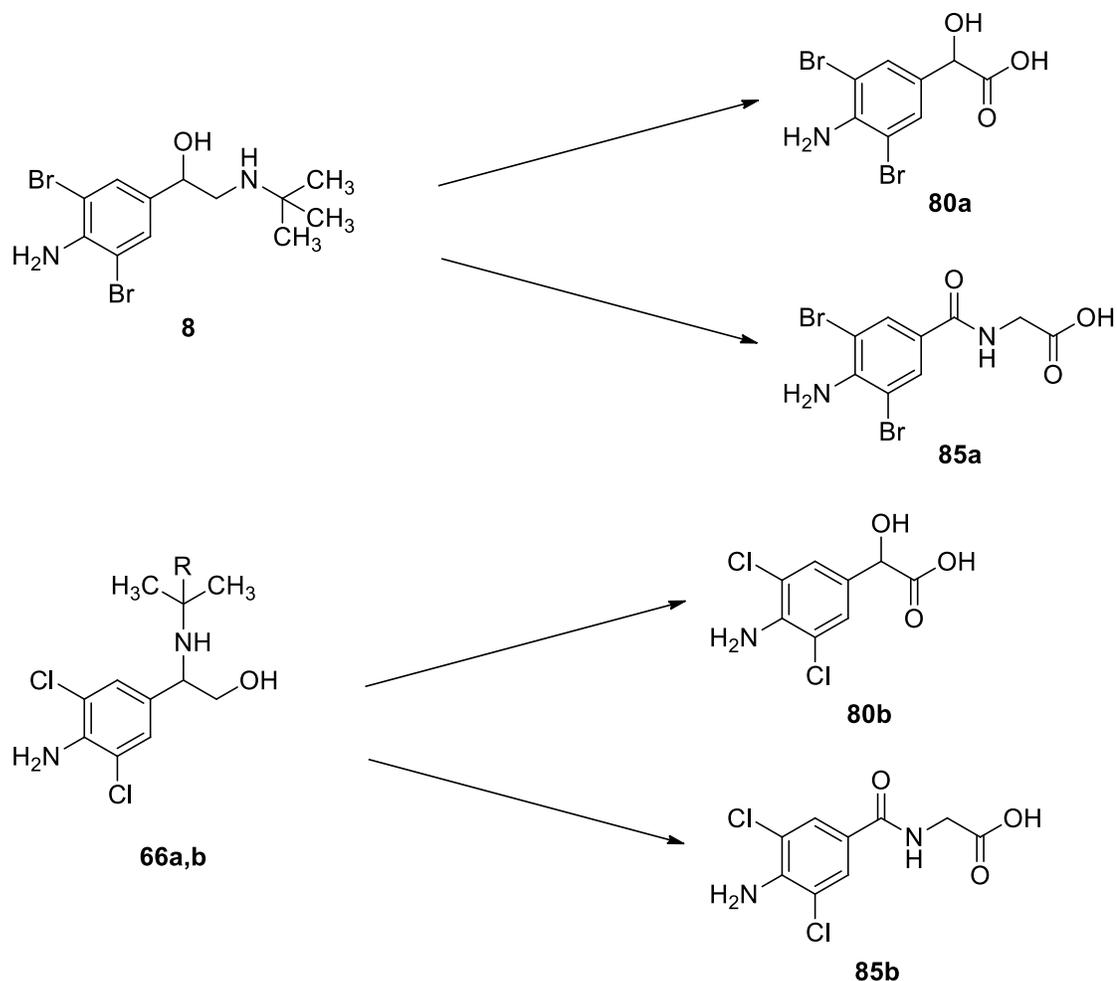


Рисунок 2.35 – β -агонисты и их метаболиты, определяемые при проведении фармакокинетических исследований

Исследования проводили на белых нелинейных крысах-самцах линии «Вистар» после однократного перорального введения препаратов **8** и **66a,b** в дозах 270 и 540 мкг/кг. Пробы крови отбирались в течение 96 ч, пробы мочи в течение 120 ч после введения препаратов.

Для определения концентраций целевых соединений и их метаболитов в биологических жидкостях необходимо было разработать аналитическую методику. Поскольку при проведении эксперимента требуется проанализировать большое количество образцов, метод должен быть простым в реализации и мало затратным. При этом он должен обеспечивать максимальную воспроизводимость и повторяемость результатов анализа. Следует отметить, что в настоящее время воспроизводимость и повторяемость

методов анализа не подвергаются сомнению, поскольку в исследованиях используют высокотехнологичное оборудование.

Для определения β -адреномиметиков в различных матрицах основными методами анализа являются методы газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием [127-148]. При использовании метода газовой хроматографии возникает ряд ограничений и усложнений в процедурах пробоподготовки, заключающиеся в обязательном проведении дериватизации аналитов, которая увеличивает время пробоподготовки и вносит дополнительную погрешность. По этой причине для анализа проб крови и мочи лабораторных животных был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, условия которого описаны в экспериментальной части. Выбранная хроматографическая колонка с обращенно-фазовым сорбентом C18 обеспечивает чувствительность и селективность в отношении широкого спектра веществ. Детектирование ионизированных соединений осуществляли в режиме мониторинга селективных реакций (SRM). В таком режиме работы масс-спектрометра происходит регистрация иона-предшественника и его ионов-продуктов, что позволяет проводить достоверную идентификацию целевых соединений в низких концентрациях, а также осуществлять их количественную оценку.

Несмотря на то, что было применено высокотехнологичное оборудование, для анализа сложных матриц, таких как кровь и моча, требуется предварительная подготовка проб, которая позволяет убрать матричные компоненты, выделить и сконцентрировать целевые соединения, тем самым обеспечить селективность и чувствительность метода. При анализе проб крови определялись только целевые соединения для расчета основных фармакокинетических параметров.

Для извлечения β -адренергических агонистов из биологических жидкостей в большинстве случаев используют методы жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) и твердофазной экстракции (ТФЭ). Процедура ЖЖЭ является наиболее простой в реализации и не требует особых приспособлений по сравнению с процедурой ТФЭ. По этой причине оценку извлечения целевых соединений из проб крови проводили методом ЖЖЭ с применением различных экстрагирующих систем. Исходя из структуры молекулы

и литературных данных, наибольший коэффициент извлечения удается достичь экстракцией в щелочных условиях, поскольку не происходит протонирование молекулы. Для этого к модельному образцу крови, содержащему целевые компоненты **8** и **66a,б** в концентрации 100 нг/мл, был добавлен карбонатный буфер (рН=10,0-10,4) для создания щелочной среды. Извлечение целевых компонентов осуществляли следующими способами:

1. экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир (9:1, об./об.),
2. экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир (9:1, об./об.) с последующей экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир / *n*-бутанол (7:2:1, об./об./об.),
3. двойной экстракцией этилацетатом,
4. экстракцией смесью гексан / хлористый метилен (85:15, об./об.),
5. экстракцией смесью гексан / изопропанол (95:5, об./об.).

Экстракты концентрировали в токе азота досуха и перерастворяли в метиловом спирте. Полученные аликвоты анализировали. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты исследований по выбору оптимальной методики пробоподготовки для извлечения соединений **8**, **66a,б** из крови

Экстрагирующая система	Коэффициент извлечения, %		
	8	66a	66б
1	75	92	71
2	77	96	73
3	86	102	79
4	69	81	74
5	73	87	70

Из данных таблицы 4 видно, что во всех случаях удалось достичь высокой степени извлечения соединений **8** и **66a,б**. Для экстракции данных β -адреномиметиков из образцов крови выбрали этилацетат, показывающий наиболее высокий коэффициент извлечения по сравнению с другими системами и не требующий дополнительных процедур приготовления.

При анализе проб мочи необходимо было разработать способ пробоподготовки, обеспечивающий одновременное определение целевых компонентов и их метаболитов. Как и в случае крови, для извлечения аналитов выбрали более простой по сравнению с ТФЭ способ ЖЖЭ. Поскольку структуры молекул исходных β -адреномиметиков и их метаболитов отличаются, с целью подбора оптимального метода исследовали три типа экстракции: щелочную, нейтральную и кислую с использованием различных экстрагирующих систем. Оптимизацию методики проводили на модельных образцах мочи путем добавления соединений **8**, **66a,б**, **80a,б**, **85a,б** в концентрации 100 нг/мл.

На первом этапе пробы мочи подвергали ферментативному гидролизу с использованием β -глюкуронидазы / арилсульфатазы для разрушения конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами. Затем путем добавления концентрированной соляной кислоты создавали кислую среду (pH=4), путем добавления фосфатного буфера (pH=6,5-6,9) – нейтральную среду (pH=6), путем добавления карбонатного буфера (pH=10,0-10,4) – щелочную среду (pH=9-10). Извлечение целевых компонентов при каждом значении pH осуществляли следующими способами:

1. экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир (9:1, об./об.),
2. экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир (9:1, об./об.) с последующей экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир / *н*-бутанол (7:2:1, об./об./об.),
3. двойной экстракцией этилацетатом,
4. экстракцией смесью гексан / хлористый метилен (85:15, об./об.),
5. экстракцией смесью гексан / изопропанол (95:5, об./об.),
6. экстракцией смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир (9:1, об./об.) с последующей экстракцией этилацетатом.

Экстракты концентрировали в токе азота досуха и перерастворяли в метиловом спирте. Полученные аликвоты анализировали. Результаты эксперимента представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследований по выбору оптимальной методики пробоподготовки для извлечения соединений **8**, **66a,б**, **80a,б**, **85a,б** из мочи

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Коэффициент извлечения, %						
		8	66a	66б	80a	80б	85a	85б
Кислая	1	50	23	57	55	32	39	18
	2	30	34	55	42	27	19	14
	3	23	25	33	33	31	9	7
	4	2	0	4	1	0	0	2
	5	5	0	3	4	2	1	0
	6	29	33	37	52	28	35	18
Нейтральная	1	22	12	63	49	24	26	14
	2	56	51	72	46	26	19	16
	3	24	28	31	34	27	18	14
	4	1	0	5	0	0	0	1
	5	2	0	3	0	0	0	0
	6	26	57	48	51	28	30	22
Щелочная	1	68	77	70	0	0	0	2
	2	70	88	73	0	0	0	3
	3	28	50	38	2	0	0	1
	4	46	42	72	0	0	0	0
	5	57	44	84	0	0	0	0
	6	71	79	73	0	0	0	0

Из результатов таблицы 5 видно, что наиболее высокие коэффициенты извлечения целевых соединений **8**, **66a,б** из мочи достигли в щелочных условиях. Однако метаболиты **80a,б** и **85a,б** в данных условиях не экстрагируются ни одной из экстрагирующих систем. Проанализировав весь массив полученных данных, для извлечения бромбутерола (**8**) и его метаболитов **80a** и **85a** выбрали кислую экстракцию смесью диэтиловый эфир / трет-бутилметилвый эфир (9:1, об./об.), коэффициент извлечения соединения **8** составил 50 %, **80a** – 55 %, **85a** – 39 %. Для извлечения 2-амино-2-арилэтанола **66a,б** и их метаболитов

806 и **856** выбрали нейтральную экстракцию смесью диэтиловый эфир / *трет*-бутилметиловый эфир (9:1, об./об.) с последующей экстракцией этилацетатом. Коэффициент извлечения **66a** составил 57 %, **66b** – 48 %, **806** – 28 %, **856** – 22 %.

Таким образом, с использованием разработанных аналитических методов были проанализированы пробы крови и мочи крыс с целью определения фармакокинетических параметров. Пробы крови отбирали через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 6; 12; 24; 36; 48; 72 и 96 ч после введения препаратов. Динамика изменения концентраций соединений **8** и **66a,б** в крови крыс после однократного перорального введения препаратов в дозах 270 мкг/мл и 540 мкг/кг представлена в таблице 6. Профили усредненных фармакокинетических кривых исследуемых соединений имеют схожий характер (рисунки 2.36-2.38). После приема наблюдается достаточно быстрый рост концентрации целевых соединений в крови лабораторных животных до максимальных значений. Затем происходит постепенное снижение концентрации веществ по зависимости, близкой к экспоненциальной.

Таблица 6 – Значения усредненных концентраций соединений **8** и **66a,б** в крови крыс после однократного перорального введения препаратов в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг

Доза препарата, мкг/кг	Время после введения препаратов, <i>t</i> , ч													
	0	0,25	0,5	1	1,5	2	3	6	12	24	36	48	72	96
Концентрация соединения 8 в крови крыс, $C \cdot 10^{-3}$, мкг/мл														
270	0	10,9	13,6	14,2	9,9	7,3	4,1	1,9	0,6	0,2	0	0	0	0
540	0	10,3	15,0	27,1	29,4	27,1	22,7	14,4	5,3	1,2	0,1	0	0	0
Концентрация соединения 66a в крови крыс, $C \cdot 10^{-3}$, мкг/мл														
270	0	43,0	38,6	25,8	24,2	15,9	13,5	9,9	4,6	3,5	2,3	0,6	0,3	0
540	0	49,1	65,9	87,3	96,4	88,2	47,9	25,7	21,1	5	1,3	1,1	0,9	0,8
Концентрация соединения 66b в крови крыс, $C \cdot 10^{-3}$, мкг/мл														
270	0	2,1	3,0	3,1	3,0	2,4	2,1	2,1	1,4	1,2	1,0	0,7	0,4	0,3
540	0	4,3	5,8	6,4	7,2	6,8	6,6	4,5	4,2	3,0	2,3	2,3	1,5	0,3

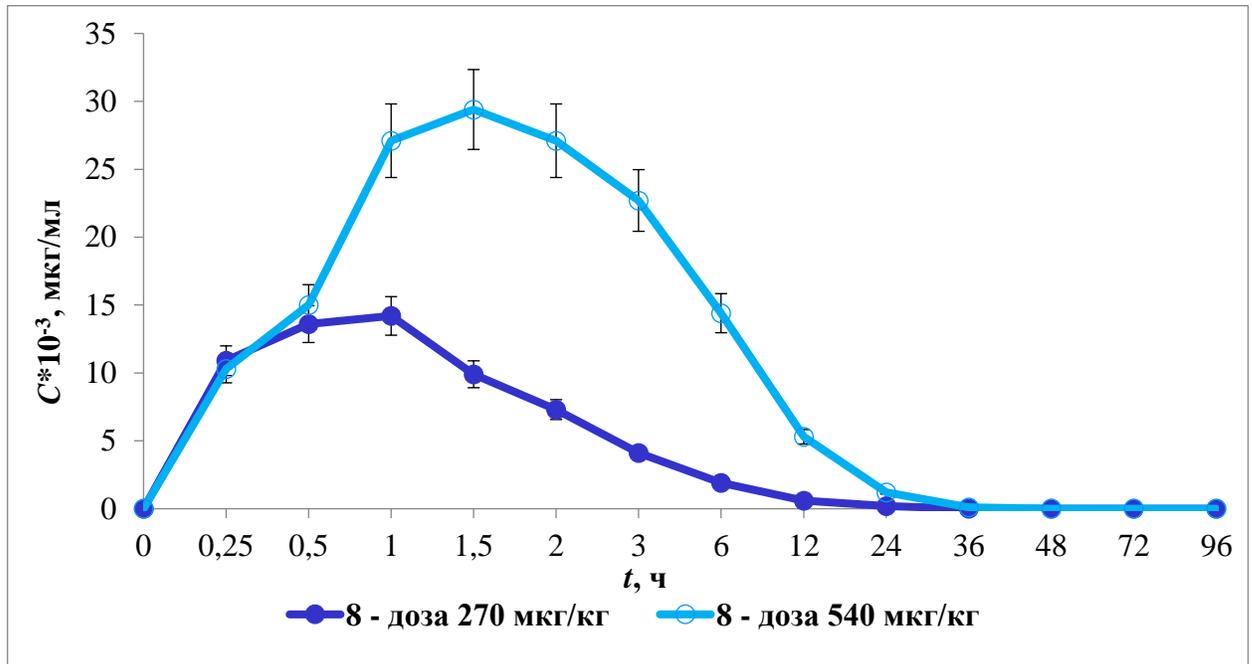


Рисунок 2.36 – Динамика изменения концентрации соединения **8** в крови крыс после однократного перорального введения препарата

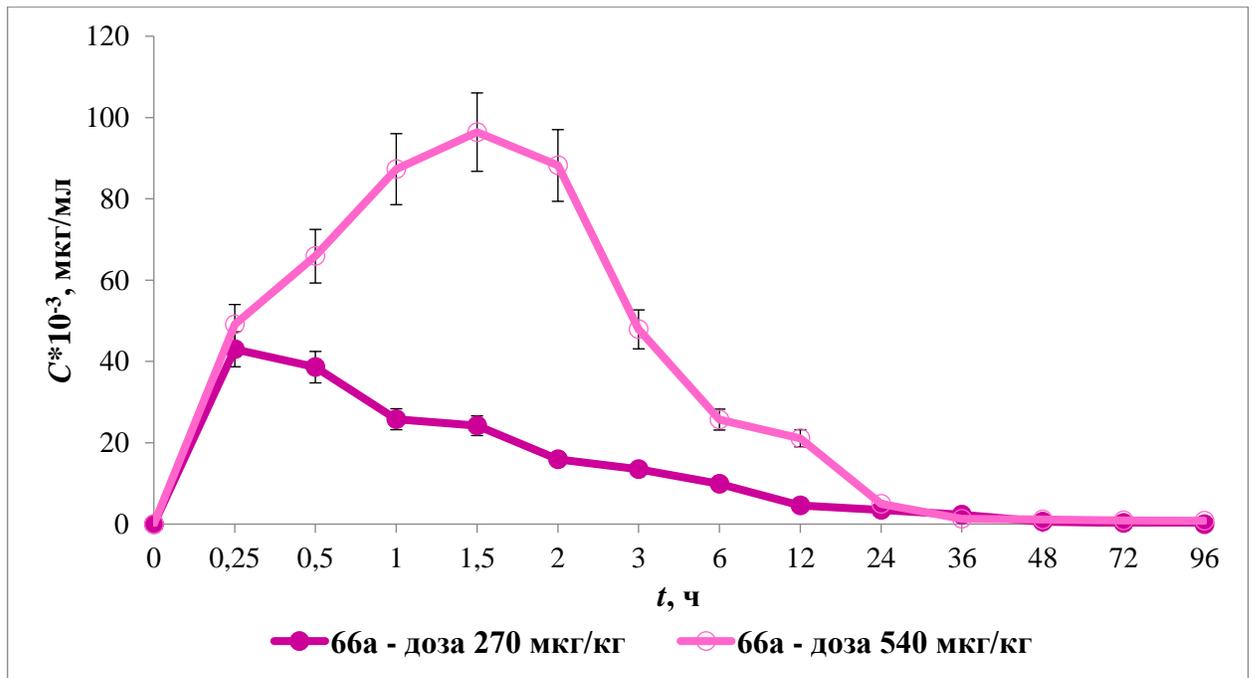


Рисунок 2.37 – Динамика изменения концентрации соединения **66a** в крови крыс после однократного перорального введения препарата

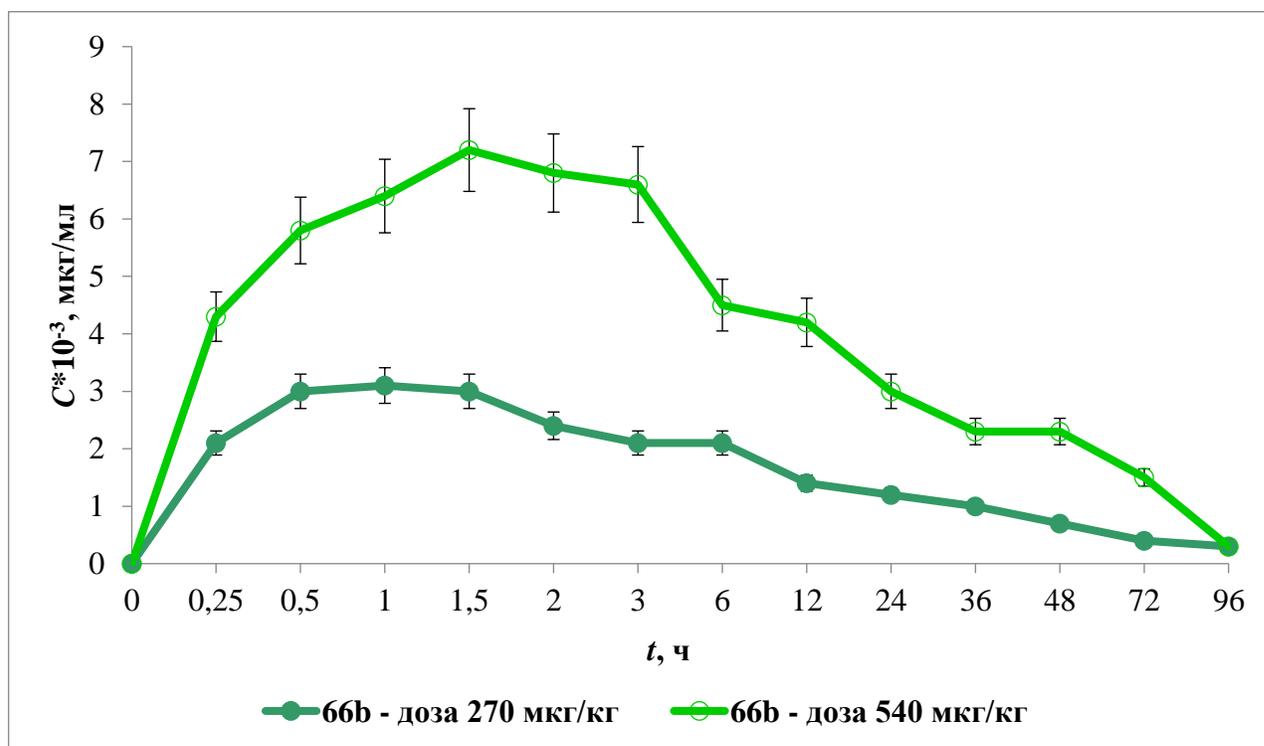


Рисунок 2.38 – Динамика изменения концентрации соединения **66б** в крови крыс после однократного перорального введения препарата

На основе полученных данных рассчитаны основные фармакокинетические параметры исследуемых соединений [179]:

C_{max} – максимальная концентрация препарата в крови;

T_{max} – время достижения максимальной концентрации препарата в крови;

$T_{1/2}$ – период полувыведения препарата;

AUC – площадь под фармакокинетической кривой (0-96 ч);

MRT – среднее время удерживания препарата в крови;

Cl_p – плазменный клиренс.

Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Фармакокинетические параметры соединений **8**, **66а,б** после однократного перорального введения препаратов в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг

Соединение	Доза, мкг/кг	Фармакокинетический показатель					
		C_{max} , нг/мл	T_{max} , ч	$T_{1/2}$, ч	AUC_{0-96} , (нг·ч)/мл	MRT , ч	Cl_p , мл/ч
8	270	14,2	1	2,2	49,9	4,6	1904
	540	29,4	1,5	5,9	222,5	7,0	854

Продолжение Таблицы 7

Соединение	Доза, мкг/кг	Фармакокинетический показатель					
		C_{max} , нг/мл	T_{max} , ч	$T_{1/2}$, ч	AUC_{0-96} , (нг·ч)/мл	MRT , ч	Clp , мл/ч
66a	270	43,0	0,25	1,4	262,7	15,0	362
	540	96,4	1,5	4,6	723,5	17,5	263
66б	270	3,1	1	10,7	99,4	40,6	956
	540	7,2	1,5	18,0	213,6	41,2	890

Согласно представленным данным значения фармакокинетических параметров зависят от дозы препарата. С увеличением дозы пропорционально возрастает значение максимальной концентрации веществ в крови: при приеме средств в дозе 270 мкг/кг данная величина для соединения **8** составляет 14,2 нг/мл, для **66a** – 43,0 нг/мл и для **66б** – 3,1 нг/мл; в дозе 540 мкг/кг – 29,4 нг/мл, 96,4 нг/мл и 7,2 нг/мл, соответственно. Аналогичная картина наблюдается для времени достижения максимальной концентрации целевых соединений в крови. Соединения **8** и **66a,б** после введения быстро всасываются в системный кровоток, при этом максимальный уровень достигается от 0,25 до 1,5 ч в зависимости от препарата и дозы.

Полученные данные по фармакокинетике позволяют определить время достижения предела детектирования соединений при чувствительности метода 0,1 нг/мл. Можно утверждать, что при однократном пероральном приеме соединение **8** перестает идентифицироваться в крови через 36 ч после приема препарата, **66a** детектируется 72 ч, а **66б** – более 96 ч. Галоген-атомы, присутствующие в молекулах исследуемых соединений, препятствуют их быстрой метаболической деактивации. При этом, период полувыведения для соединения **8** составил от 2,2 до 5,9 ч в зависимости от дозы препарата, для **66a** – от 1,4 до 4,6 ч, для **66б** – от 10,7 до 18,0 ч; среднее время удерживания для соединения **8** – от 4,6 до 7,0 ч, для **66a** – от 15,0 до 17,5 ч, для **66б** – от 40,6 до 41,2 ч.

Важным параметром оценки фармакокинетики является показатель AUC , отражающий количество вещества, поступившего в кровь после однократного введения препарата. Несмотря на то, что время достижения максимальной концентрации для всех

исследуемых соединений схоже, площадь под кривой у соединения **66a** в зависимости от дозы в 2-5 раз выше, чем у соединений **8** и **66b**.

Плазменный клиренс, показатель скорости очищения плазмы крови от веществ в процессе их биотрансформации, с увеличением дозы соединений **8** и **66a** уменьшается, в то время как для **66b** остается неизменным. При этом минимальное значение параметра наблюдается для соединения **66a**.

В результате работы исследовали фармакокинетику соединений **8** и **66a,б** по динамике изменения их концентрации в крови лабораторных животных и рассчитаны основные фармакокинетические параметры. Полученные результаты могут быть использованы в медицинских целях для разработки лекарственных форм соединений **8** и **66a,б**, оптимизации условий использования препаратов в клинической практике и оценки влияния данных соединений на людей и животных.

Как уже было отмечено ранее, для более полной оценки соединений с точки зрения фармакокинетических исследований большое значение имеет изучение путей биотрансформации поступающих в организм веществ. Выведение целевых соединений **8** и **66a,б** и их метаболитов **80a,б** и **85a,б** изучали на протяжении 120 ч после однократного перорального введения препаратов в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг. Сбор мочи проводили через 2; 4; 6; 8; 24; 48; 72; 96 и 120 ч после введения препаратов. Динамика изменения концентраций соединений **8** и **66a,б** и их метаболитов **80a,б** и **85a,б** представлена в таблице 8. Усредненные профили кривых исследуемых соединений имеют схожий характер (рисунки 2.39-2.41). Максимальная концентрация для всех соединений наблюдается в период от 0 до 2 ч после их введения, затем происходит постепенное снижение концентрации по кривой, близкой к экспоненциальной.

Таблица 8 – Значения усредненных концентраций соединений **8**, **66а,б** и их метаболитов **80а,б** и **85а,б** в моче крыс после однократного перорального введения препаратов в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг

Доза препарата, мкг/кг	Соединение	Время после введения препарата, <i>t</i> , ч								
		2	4	6	8	24	48	72	96	120
Концентрация соединения 8 и его метаболитов 80а , 85а в моче, $C \cdot 10^{-3}$, мкг/мл										
270	8	241,8	165,1	213,4	123,4	21,0	3,4	0,3	0	0
	80а	386,2	203,6	193,7	101,1	50,4	45,7	10,6	6,1	0
	85а	268,7	185,6	237,0	163,2	62,0	6,5	0	0	0
540	8	556,2	436,9	442,3	152,3	36,0	5,2	0,9	0	0
	80а	1102,4	549,6	450,4	352,2	111,3	15,5	1,6	0	0
	85а	528,3	429,5	355,3	306,4	121,9	38,0	0,1	0	0
Концентрация соединения 66а и его метаболитов 80б , 85б в моче, $C \cdot 10^{-3}$, мкг/мл										
270	66а	1305,1	652,0	785,6	295,1	33,9	3,6	1,4	1,0	0,6
	80б	1625,6	713,5	1434,8	554,9	93,7	9,3	5,3	0	0
	85б	684,7	258,4	374,3	201,9	93,7	12,1	5,8	6,3	0
540	66а	1845,6	656,1	1457,3	536,9	204,7	18,6	5,2	8,1	0,5
	80б	2642,6	2120,9	2329,5	1966,2	221,1	28,0	7,9	7,2	0
	85б	1401,3	893,4	1036,5	803,4	185,6	6,4	2,8	3,2	0
Концентрация соединения 66б и его метаболитов 80б , 85б в моче, $C \cdot 10^{-3}$, мкг/мл										
270	66б	195,0	38,8	18,1	5,4	3,2	2,0	1,2	0,1	0
	80б	1564,1	691,4	265,3	213,3	46,4	2,9	0	0	0
	85б	2316,2	793,6	358,4	415,3	116,9	18,3	8,5	8,0	6,3
540	66б	437,4	78,5	37,8	11,0	7,9	2,9	1,5	0,3	0
	80б	3834,5	1595,7	631,5	507,6	60,9	6,9	5,6	0	0
	85б	7862,3	2492,0	1111,1	1287,4	295,8	60,9	22,9	25,1	8,8

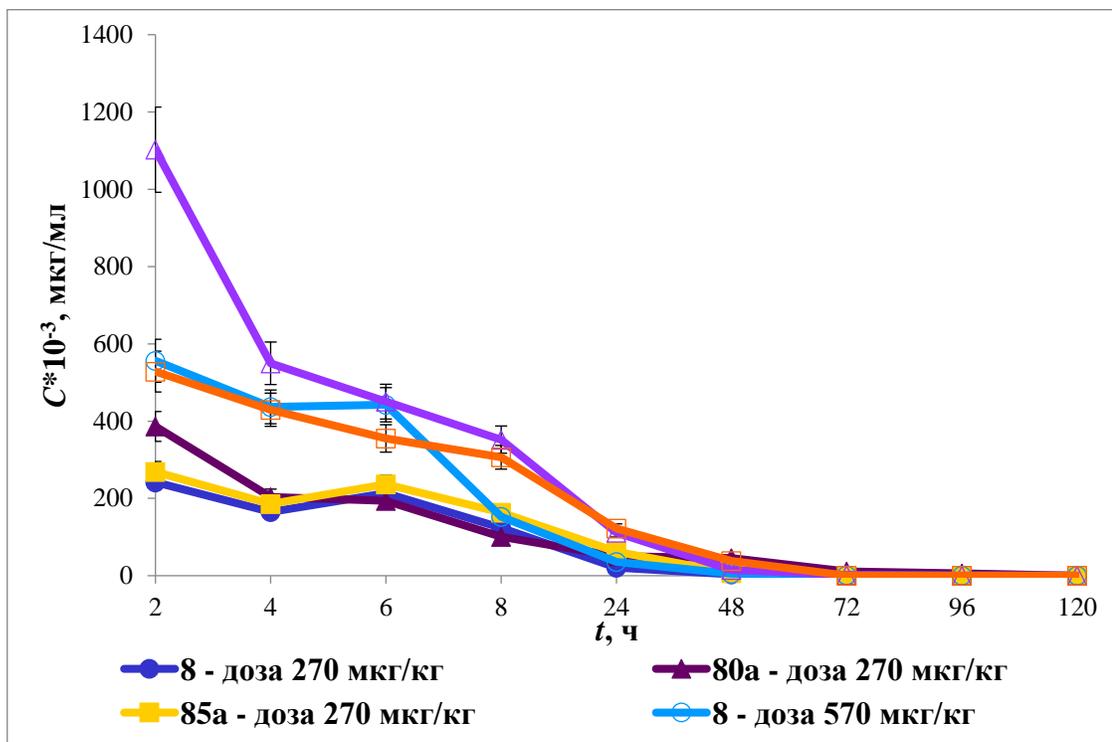


Рисунок 2.39 – Зависимость изменения концентрации соединения **8** и его метаболитов **80a**, **85a** в моче крыс от времени после его однократного перорального введения

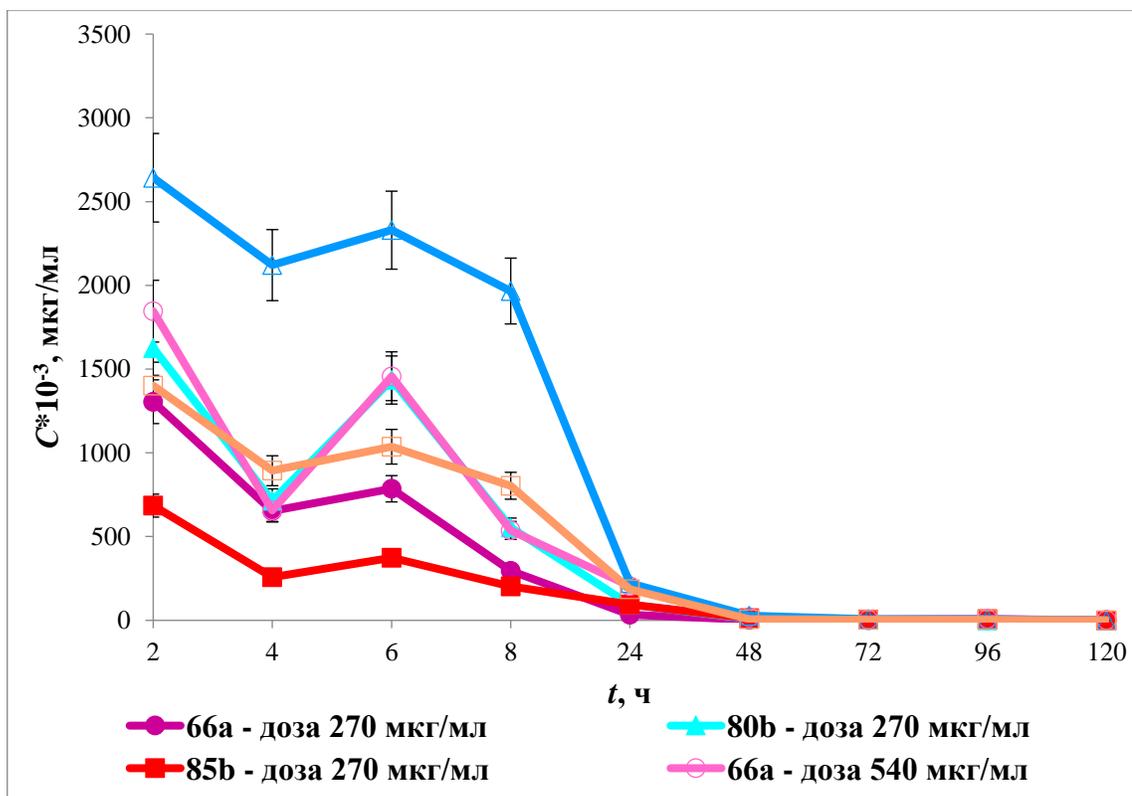


Рисунок 2.40 – Зависимость изменения концентрации соединения **66a** и его метаболитов **80b**, **85b** в моче крыс от времени после его однократного перорального введения

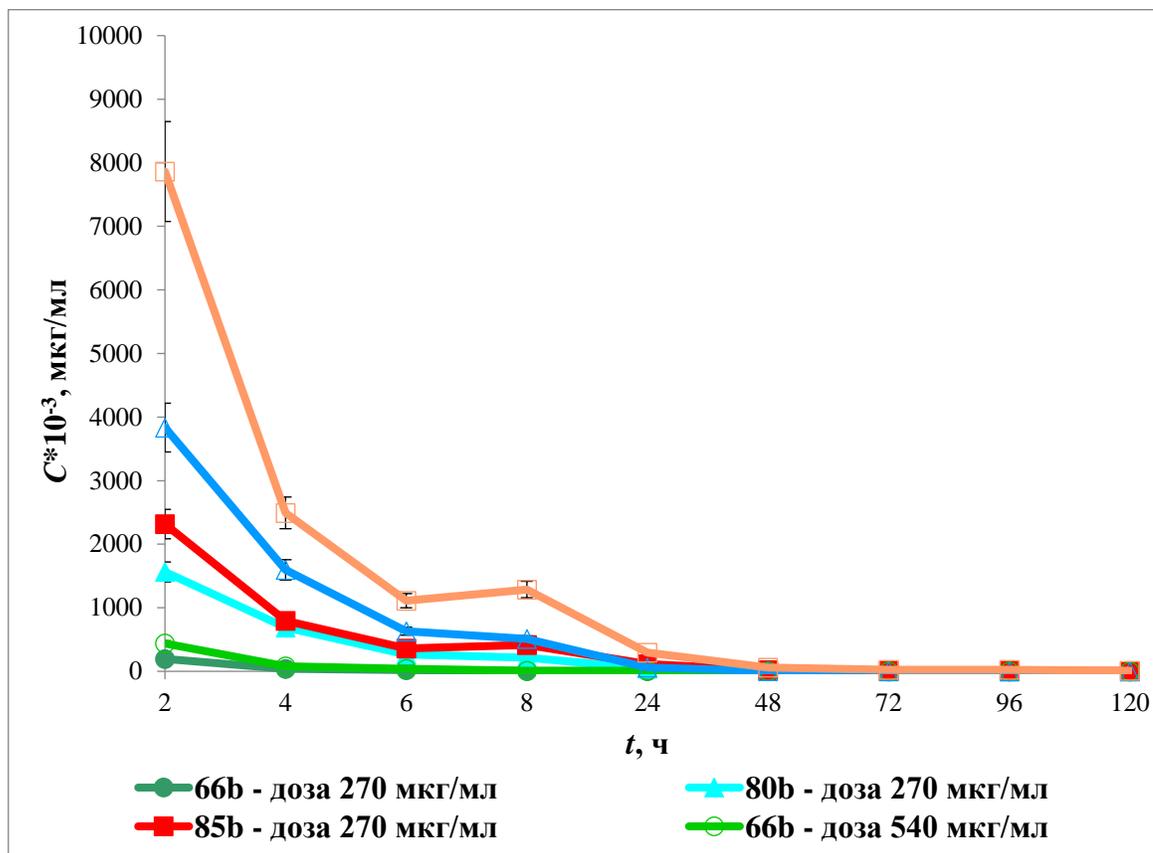


Рисунок 2.41 – Зависимость изменения концентрации соединения **66б** и его метаболитов **80б**, **85б** в моче крыс от времени после его однократного перорального введения

Полученные данные позволяют определить время достижения предела определения целевых компонентов и их метаболитов в моче лабораторных животных. Можно утверждать, что при однократном пероральном приеме при чувствительности метода 0,1 нг/мл соединение **8** перестает идентифицироваться в моче через 72 ч после приема препарата, его метаболиты **80а** – через 72 ч, **85а** – через 48 ч. Соединение **66а** идентифицируется более 120 ч в моче, его метаболит **80б** перестает идентифицироваться через 72 ч, **85б** – через 96 ч. Детекция соединения **66б** в моче была возможна в период 96 ч после приема препарата, его метаболитов **80б** – в течение 48 ч, **85б** – более 120 ч. Как видно из представленных данных, целевые соединения и их метаболиты идентифицируются в моче длительный период времени. Галоген-атомы, присутствующие в молекулах соединений, препятствуют их быстрой метаболической деактивации. При этом метаболит **85б** соединения **66б** детектируется в моче более продолжительное время, чем исходное соединение, что является подтверждающим признаком установления факта использования препаратов в качестве кормовых добавок.

С точки зрения фармакокинетики интерес представляет показатель суммарной экскреции веществ с мочой. В таблицах 9-11 представлены данные о суммарной экскреции соединений **8** и **66a,б** и их метаболитов **80a,б** и **85a,б** с мочой к каждому из сроков наблюдения, для каждого соединения установлена динамика экскреции и подсчитана величина суммарной экскреции (ΣM_{\max}).

Таблица 9 – Экскреция соединения **8** и его метаболитов **80a**, **85a** с мочой крыс после однократного перорального введения препарата в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг

Время после введения препарата, ч	Количество экскретированного соединения 8 и его метаболитов 80a , 85a , мкг					
	Доза препарата – 270 мкг/кг			Доза препарата – 540 мкг/кг		
	8	80a	85a	8	80a	85a
2	0,3 (0,3)*	0,50 (0,5)	0,35 (0,4)	2,78 (1,5)	2,32 (1,2)	1,23 (0,6)
4	1,47 (1,5)	1,93 (2,0)	1,65 (1,7)	3,66 (1,9)	9,53 (5,0)	5,49 (2,9)
6	2,05 (2,2)	2,45 (2,6)	2,29 (2,4)	4,10 (2,2)	12,61 (6,6)	7,88 (4,1)
8	2,54 (2,7)	3,49 (3,7)	3,36 (3,5)	4,27 (2,3)	13,87 (7,3)	9,74 (5,1)
24	2,72 (2,9)	4,06 (4,3)	4,27 (4,5)	4,35 (2,3)	15,08 (7,9)	10,02 (5,3)
48	2,76 (2,9)	4,66 (4,9)	4,36 (4,6)	4,40 (2,3)	15,24 (8,0)	10,40 (5,5)
72	2,77 (2,9)	4,66 (4,9)	4,36 (4,6)	4,40 (2,3)	15,24 (8,0)	10,40 (5,5)
96	2,77 (2,9)	4,66 (4,9)	4,36 (4,6)	4,40 (2,3)	15,24 (8,0)	10,40 (5,5)
120	2,77 (2,9)	4,66 (4,9)	4,36 (4,6)	4,40 (2,3)	15,24 (8,0)	10,40 (5,5)
ΣM_{\max}	2,77 (2,9)	4,66 (4,9)	4,36 (4,6)	4,40 (2,3)	15,24 (8,0)	10,40 (5,5)
* - в скобках указан % от введенной дозы препарата						

Таблица 10 – Экскреция соединения **66a** и его метаболитов **80б**, **85б** с мочой крыс после однократного перорального введения препарата в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг

Время после введения препарата, ч	Количество экскретированного соединения 66a и его метаболитов 80б , 85б , мкг					
	Доза препарата – 270 мкг/кг			Доза препарата – 540 мкг/кг		
	66a	80б	85б	66a	80б	85б
2	3,26 (3,4)*	4,06 (4,3)	1,71 (1,8)	4,61 (2,4)	6,61 (3,5)	3,50 (1,8)
4	6,52 (6,9)	6,56 (5,9)	2,62 (2,8)	6,91 (3,6)	17,21 (9,1)	7,97 (4,2)
6	6,75 (7,1)	9,43 (9,9)	3,37 (3,5)	9,82 (5,2)	19,37 (10,2)	8,87 (4,7)

Продолжение Таблицы 10

Время после введения препарата, ч	Количество экскретированного соединения 66a и его метаболитов 806 , 856 , мкг					
	Доза препарата – 270 мкг/кг			Доза препарата – 540 мкг/кг		
	66a	806	856	66a	806	856
8	7,05 (7,4)	9,95 (10,5)	3,96 (4,2)	10,86 (5,7)	20,75 (10,9)	9,42 (5,0)
24	7,25 (7,6)	10,79 (11,4)	4,72 (5,0)	12,79 (6,7)	22,08 (11,6)	10,53 (5,5)
48	7,27 (7,7)	10,83 (11,4)	4,79 (5,0)	12,89 (6,8)	22,22 (11,7)	10,56 (5,6)
72	7,29 (7,7)	10,87 (11,4)	4,82 (5,1)	12,92 (6,8)	22,26 (11,7)	10,58 (5,6)
96	7,29 (7,7)	10,87 (11,4)	4,86 (5,1)	12,97 (6,8)	22,28 (11,7)	10,58 (5,6)
120	7,29 (7,7)	10,87 (11,4)	4,86 (5,1)	12,97 (6,8)	22,28 (11,7)	10,58 (5,6)
ΣM_{\max}	7,29 (7,7)	10,87 (11,4)	4,86 (5,1)	12,97 (6,8)	22,28 (11,7)	10,58 (5,6)
* - в скобках указан % от введенной дозы препарата						

Таблица 11 – Экскреция соединения **666** и его метаболитов **806**, **856** с мочой крыс после однократного перорального введения препарата в дозах 270 мкг/кг и 540 мкг/кг

Время после введения препарата, ч	Количество экскретированного соединения 666 и его метаболитов 806 , 856 , мкг					
	Доза препарата – 270 мкг/кг			Доза препарата – 540 мкг/кг		
	666	806	856	666	806	856
2	0,20 (0,2)*	1,56 (1,6)	2,32 (2,4)	0,44 (0,2)	3,83 (2,0)	7,86 (4,1)
4	0,35 (0,4)	4,33 (4,6)	5,49 (5,8)	0,48 (0,3)	4,79 (2,5)	9,36 (4,9)
6	0,36 (0,4)	4,75 (5,0)	6,45 (6,8)	0,56 (0,3)	6,06 (3,2)	11,58 (6,1)
8	0,37 (0,4)	5,29 (5,6)	7,36 (7,7)	0,60 (0,3)	6,42 (3,4)	13,90 (7,3)
24	0,41 (0,4)	5,87 (6,2)	8,82 (9,3)	0,68 (0,4)	6,97 (3,7)	16,02 (8,4)
48	0,44 (0,5)	5,91 (6,2)	9,10 (9,6)	0,72 (0,4)	7,07 (3,7)	16,93 (8,9)
72	0,46 (0,5)	5,91 (6,2)	9,22 (9,7)	0,75 (0,4)	7,15 (3,8)	17,26 (9,1)
96	0,46 (0,5)	5,91 (6,2)	9,32 (9,8)	0,75 (0,4)	7,15 (3,8)	17,55 (9,2)
120	0,46 (0,5)	5,91 (6,2)	9,41 (9,9)	0,75 (0,4)	7,15 (3,8)	17,64 (9,3)
ΣM_{\max}	0,46 (0,5)	5,91 (6,2)	9,41 (9,9)	0,75 (0,4)	7,15 (3,8)	17,64 (9,3)
* - в скобках указан % от введенной дозы препарата						

Из данных, приведенных в таблицах 9-11, следует, что экскреция соединений **8**, **66a,б** в неизменном виде с мочой не является основным путем их выведения. Этим путем выводится в среднем 2,6 % от введенной дозы соединения **8**, 7,3 % **66a** и 0,5 % **66б**. Известно, что биодоступность кленбутерола, ближайшего структурного аналога, при пероральном приеме составляет 70-80% [10]. Если предположить, что биодоступность исследуемых соединений при аналогичном способе введения такая же, как и для кленбутерола, то экскреция соединения **8** составит 3,5 %, **66a** – 9,7%, **66б** – 0,7%. Очевидно, основная масса вводимых препаратов подвергается метаболическим превращениям и экскреции с другими биологическими жидкостями.

В таблицах 9-11 также представлены данные экскреции метаболитов исследуемых соединений. Видно, что для соединения **8** количество выведенных метаболитов почти одинаковое (**80a** – 6,5 %, **85a** – 5,1 %), для соединения **66a** количество выведенного метаболита **80б** (11,6 %) превышает количество метаболита **85б** (5,4 %) вдвое, для соединения **66б** наблюдается обратная зависимость: количество выведенного метаболита **80б** составляет 5,0 %, **85б** – 9,6 %. Несмотря на близкое структурное сходство и одинаковые пути биотрансформации, экскреция препаратов различна, что играет большую роль при изучении фармакокинетики соединений **8** и **66a,б**.

В результате изучен профиль экскреции как целевых соединений **8**, **66a,б**, так и их метаболитов **80a,б** и **85a,б** с мочой лабораторных животных. Полученные результаты могут быть использованы в медицинских целях для разработки лекарственных препаратов соединений **8**, **66a,б**, оптимизации условий использования препаратов в клинической практике, оценки безопасности мясной продукции, поступающей на российский рынок из ряда зарубежных стран. Также в ходе работы разработали методику одновременного определения целевых компонентов и их метаболитов в моче, позволяющую детектировать соединения в концентрации от 0,1 нг/мл и выше. Данную методику апробировали на биологических образцах лабораторных животных.

2.5 Разработка и апробация методики определения β -агонистов и их метаболитов в печени животных

Как уже упоминалось ранее, в настоящее время большой проблемой является применение β -адреномиметиков в качестве добавок в корм сельскохозяйственных животных для увеличения привеса. В Российской Федерации использование данных соединений запрещено и строго регламентируется. С каждым годом количество применяемых веществ данной группы увеличивается. В литературных источниках, посвященных разработке методик определения группы β -агонистов в печени и других органах и тканях, описаны случаи обнаружения данных соединений в биологических образцах животных и кормах: кленбутерола [127, 135, 152], кленпроперола [135], бромбутерола [142], мабутерола [152], рактопамина [127, 142], циматерола [128], гидроксиметилкленбутерола [142]. В связи с этим, актуальной является задача по поиску высокоселективного и чувствительного метода определения широкого ряда β -адреномиметиков в следовых количествах в мясных продуктах питания.

Заключительным этапом работы является разработка аналитической методики одновременного определения β -агонистов и их метаболитов в образцах печени сельскохозяйственных животных и апробация данной методики на субпродуктах, поступающих на российские рынки из-за рубежа. Определение метаболитов наряду с целевыми соединениями играет большую роль, поскольку метаболиты, как было показано ранее при изучении фармакокинетики, могут идентифицироваться в тканях продолжительное время, что является дополнительным подтверждающим фактом использования препаратов в качестве кормовых добавок.

Для разработки методики использовали модельные образцы печени российских производителей с внесенной добавкой синтезированных стандартных образцов β -агонистов и их метаболитов в концентрации 100 нг/г. Анализ проб проводили методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения. Данный метод обладает высокой чувствительностью, точностью и селективностью по отношению к анализируемым веществам в низких концентрациях. Печень является сложным объектом

исследования, по этой причине требуется предварительная подготовка проб для удаления матричных компонентов.

На первом этапе пробоподготовки отбирали навеску печени массой 5 г, добавляли к ней ацетатный буфер (5,2 М, рН=4,8) и гомогенизировали. Полученный гомогенат центрифугировали и отбирали надосадочный слой. Затем проводили ферментативный гидролиз с целью разрушения конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами. Реакцию осуществляли с использованием β -глюкуронидазы / арилсульфатазы при температуре 37 °С в течение ночи. Далее гидролизованный экстракт подвергали очистке. В литературных источниках были найдены методики извлечения β -агонистов из печени, в которых основным методом очистки является ТФЭ [127, 133, 135, 137-140, 149, 150]. При этом перед проведением ТФЭ рН экстракта для избежания протонирования молекул доводят до щелочных условий. Поскольку цель работы заключается в одновременном определении β -агонистов и их метаболитов, отличающихся друг от друга структурой, в ходе эксперимента были рассмотрены способы очистки методом ЖЖЭ и ТФЭ при различных условиях рН. На первом этапе разработки метода были апробированы следующие способы:

1 способ – двойная ЖЖЭ в щелочных условиях. рН экстракта после гидролиза довели до 10 добавлением карбонатного буфера (рН=10,0-10,4) и провели экстракцию смесью диэтилового эфира / *трет*-бутилметилового эфира (9:1, об./об.) с последующей экстракцией этилацетатом. Органический экстракт высушили досуха в токе азота и перерастворили в 0,1 мл метилового спирта.

2 способ – двойная ЖЖЭ в кислых, нейтральных и щелочных условиях. Проба после гидролиза была проэкстрагирована смесью диэтилового эфира / *трет*-бутилметилового эфира (9:1, об./об.) с последующей экстракцией этилацетатом. Органический отобрали и к остатку добавили фосфатный буфер (рН=6,5-6,9) с целью создания рН 6-7. Затем провели аналогичную двойную экстракцию и органический слой отбирали. К остатку добавили карбонатный буфер (рН=10,-10,4) для проведения щелочной экстракции аналогичными растворителями (рН экстракта – 9-10). Отбрали органический слой. Объединенный органический слой после трех экстракций высушили досуха в токе азота и перерастворили в 0,1 мл метилового спирта.

3 способ – ЖЖЭ экстракция в кислых условиях с последующей двойной очисткой методом ТФЭ на сорбентах HLB и МСХ. Была реализована методика, описанная в литературе [135]. В статье предложен способ извлечения 16 β -агонистов из печени, почек и мышц животных. Пробоподготовка образцов заключалась в двойной экстракции целевых компонентов из гидролизата хлорной кислотой. Затем рН экстракта довели до 4 раствором гидроксида натрия и подвергли очистке методом ТФЭ с использованием сорбента HLB. Элюирование проводили смесью метилового спирта и воды (70:30, об./об.). Затем полученный элюат дополнительно очищали с использованием сорбента МСХ, в качестве элюирующей смеси использовали 3 % раствор аммиака в метиловом спирте. Конечный элюат высушили досуха в токе азота и перерастворили в 0,1 мл метилового спирта.

4 способ – ЖЖЭ экстракция в кислых условиях с последующей очисткой методом ТФЭ на сорбенте HLB. Аналогичен 3 способу без дополнительной очистки на сорбенте МСХ.

5 способ – Осаждение белков ацетонитрилом. К аликвоте полученного после гидролиза экстракта добавили ацетонитрил с целью осаждения белков, полученный надосадочный слой проанализировали.

Результаты анализа проб, приготовленных пятью способами, представлены в таблице 12. Также по каждой методике подготовили «бланковые» образцы печени (в которые целевые соединения не вносили), β -агонисты и их метаболиты в них обнаружены не были.

Таблица 12 – Коэффициент извлечения β -агонистов и их метаболитов из образцов печени, подготовленных пятью различными способами

Соединение	Коэффициент извлечения, %				
	1 способ	2 способ	3 способ	4 способ	5 способ
5а	15	13	0	0	12
5б	15	15	0	0	11
5в	17	28	0	0	8
8	13	20	0	0	7
11	23	22	0	0	0

Продолжение Таблицы 12

Соединение	Коэффициент извлечения, %				
	1 способ	2 способ	3 способ	4 способ	5 способ
17	18	9	0	0	19
21a	3	2	0	0	0
21б	4	0	0	0	0
24	5	2	0	0	0
30a	0	2	0	0	0
30б	1	1	0	2	11
33	4	1	0	0	0
35	3	2	0	0	0
42	10	9	17	5	0
49	0	0	0	0	0
58	13	29	0	0	7
64	14	17	0	0	11
66a	21	25	0	0	1
66б	20	39	0	0	2
68	3	2	0	0	0
78a	21	28	0	0	3
78б	23	25	0	0	8
80a	1	17	0	0	13
80б	0	22	1	0	0
85a	1	10	1	0	17
85б	1	6	0	0	10
90	6	8	0	1	8

Из результатов таблицы видно, что ни по одному способу не удалось достичь приемлемых коэффициентов извлечения. В связи с этим апробировали другие методы пробоподготовки, описанные в литературе. Так в статье [149] предложена методика

извлечения циматерола и кленбутерола из печени путем добавления непосредственно к навеске гомогенизированного образца 0,01 М раствора соляной кислоты и проведения двойной экстракции. Полученный экстракт очищали методом ТФЭ с использованием сорбента С18, в качестве элюента использовали метиловый спирт. Было принято решение реализовать данную методику и помимо сорбента С18 использовать картриджи МСХ и НЛВ для проведения ТФЭ. Элюирование с картриджа НЛВ осуществляли также метиловым спиртом, а с картриджа МСХ – 5 % раствором аммиака в метиловом спирте согласно методике [137]. Данный эксперимент также не привел к положительному результату, коэффициент извлечения для большинства β -агонистов и их метаболитам составил менее 10 %.

В статье китайских ученых [180] описан метод анализа тербуталина, кленбутерола и сальбутамола в печени животных, заключающийся в очистке гидролизованного экстракта с рН=5 на картридже МСХ, элюирование проводили смесью хлороформ / изопропанол / аммиак (80:20:5). Взяв за основу данную методику, экстракт после гидролиза, приготовленный по методу, описанному при разработке 5 способов, без изменения рН очищали методом ТФЭ с использованием картриджей МСХ и НЛВ. В качестве элюирующих смесей использовали 5 % раствор аммиака в метиловом спирте, 1 % раствор триэтиламина в этилацетате и 1 % раствор трифторуксунной кислоты в метиловом спирте. Результаты эксперимента представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Коэффициент извлечения β -агонистов и их метаболитов из образцов печени, подготовленных методом ТФЭ с использованием картриджей МСХ и НЛВ с различными элюирующими системами

Соединение	Коэффициент извлечения, %					
	Картридж МСХ			Картридж НЛВ		
	5 % NH ₃ в МеОН	1 % Et ₃ N в EtAc	1 % CF ₃ COOH в МеОН	5 % NH ₃ в МеОН	1 % Et ₃ N в EtAc	1 % CF ₃ COOH в МеОН
5a	0	54	16	38	35	0
5б	0	59	22	0	0	0
5в	0	70	8	1	0	0
8	0	65	11	6	0	0
11	0	77	46	0	0	0

Продолжение Таблицы 13

Соединение	Коэффициент извлечения, %					
	Картридж MCX			Картридж HLB		
	5 % NH ₃ в MeOH	1 % Et ₃ N в EtAc	1 % CF ₃ COOH в MeOH	5 % NH ₃ в MeOH	1 % Et ₃ N в EtAc	1 % CF ₃ COOH в MeOH
17	0	38	39	18	19	9
21a	22	23	10	5	5	5
21b	0	40	11	15	19	18
24	7	39	18	3	5	2
30a	5	42	22	1	2	2
30b	0	32	9	0	0	0
33	0	97	11	23	1	0
35	1	102	15	16	3	0
42	0	28	0	18	42	62
49	0	22	2	0	2	2
58	0	79	10	1	0	0
64	1	31	1	0	0	1
66a	0	73	29	44	33	0
66b	0	66	20	0	0	0
68	23	23	13	6	4	4
78a	0	82	12	3	0	0
78b	0	69	32	0	0	0
80a	0	56	1	13	9	2
80b	0	13	0	14	10	0
85a	1	37	26	20	18	14
85b	0	60	23	8	7	18
90	0	27	22	45	60	0

Из представленных в таблице данных видно, что наиболее высокий коэффициент извлечения всей группы соединений одновременно удалось достичь с использованием картриджа с сорбентом МСХ и 1 % раствором триэтиламина в этилацетате в качестве элюента. Данный способ пробоподготовки был выбран для анализа проб печени. Схема основных этапов пробоподготовки представлена на рисунке 2.42.

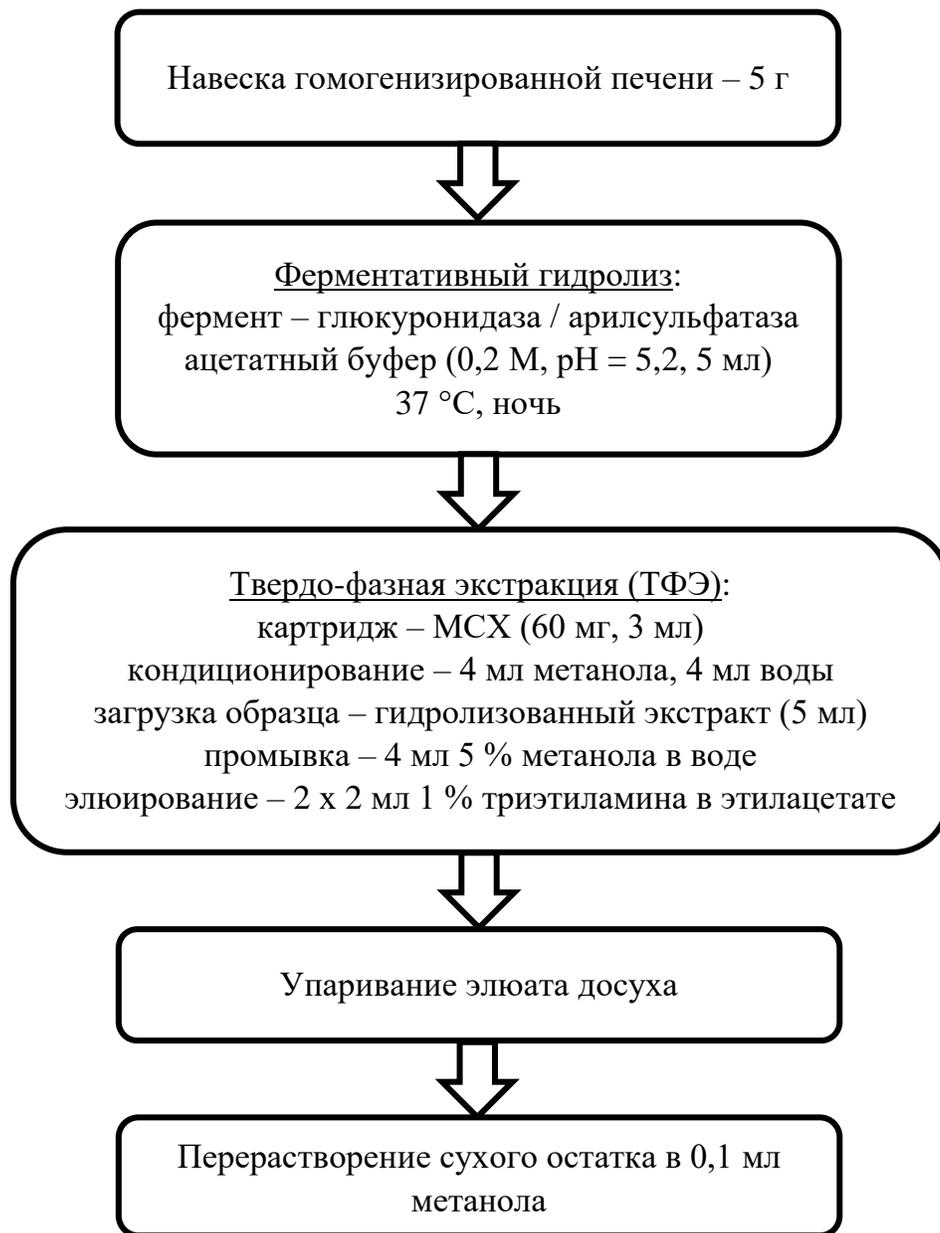


Рисунок 2.42 – Схема основных этапов пробоподготовки образцов печени животных

Для качественного и количественного анализа модельных образцов использовали хроматографическую систему «Vanquish», совмещенную с гибридным масс-спектрометром высокого разрешения «Q-Exactive HF-X». Масс-спектрометрический детектор оснащен

нагреваемым источником ионизации, квадрупольным фильтром заряженных частиц, высокоэффективной ячейкой соударений и орбитальной ионной ловушкой. Данная система обладает большой скоростью сканирования и более высокой чувствительностью по сравнению с аналогичными средствами измерений. Предел детектирования β -агонистов и их метаболитов в калибровочных растворах составил от 0,5 до 10 нг/мл, что позволяет анализировать данные соединения в следовых количествах.

Для подтверждения работоспособности методики были подготовлены модельные образцы печени с внесенной добавкой β -агонистов и их метаболитов в концентрациях 0,5; 1; 5; 10 нг/г с целью обнаружения в них следовых количеств целевых соединений и определения степени извлечения. В качестве бланковых образцов использовали образцы печени российских производителей, предварительный анализ которых показал отсутствие в них целевых соединений. Результаты анализа модельных проб представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Предел детектирования β -агонистов и их метаболитов в растворах и степень извлечения целевых соединений из модельных образцов печени

Соединение	Предел детектирования в растворе, нг/мл	Степень извлечения β -агонистов и их метаболитов из модельных образцов печени, %				
		бланк	0,5 нг/г	1 нг/г	5 нг/г	10 нг/г
5a	5	0	48	60	53	55
5б	1	0	57	56	60	63
5в	1	0	65	78	72	63
8	1	0	64	61	68	67
11	0,5	0	70	81	80	77
17	0,5	0	38	43	33	38
21a	0,5	0	22	19	27	24
21б	1	0	40	41	42	38
24	1	0	41	39	37	39
30a	1	0	37	42	44	45
30б	1	0	30	30	35	33
33	0,5	0	95	91	101	101

Продолжение Таблицы 14

Соединение	Предел детектирования в растворе, нг/мл	Степень извлечения β -агонистов и их метаболитов из модельных образцов печени, %				
		бланк	0,5 нг/г	1 нг/г	5 нг/г	10 нг/г
35	0,5	0	99	105	98	106
42	5	0	28	25	30	29
49	5	0	24	21	21	22
58	1	0	75	85	80	76
64	5	0	29	28	35	32
66a	5	0	69	68	77	78
66b	5	0	61	72	62	69
68	0,5	0	27	23	21	21
78a	1	0	79	84	84	81
78b	1	0	65	71	65	75
80a	10	0	53	60	57	54
80b	10	0	11	16	14	11
85a	10	0	35	35	41	37
85b	10	0	66	59	60	55
90	1	0	25	24	30	29

Из результатов таблицы 14 видно, что β -агонисты и их метаболиты детектируются во всех модельных образцах печени, тем самым подтверждая чувствительность и селективность разработанной методики.

По разработанной методике проанализировали 10 купленных в магазинах г. Москвы и г. Владимира образцов говяжьей и свиной печени, поступивших на российские рынки из Аргентины, Бразилии и Чили. В данных образцах β -агонистов и их метаболитов обнаружено не было.

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Экспериментальная химическая часть

Коммерчески доступные реагенты и растворители использовали без дополнительной очистки. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ТСХ. Структура промежуточных соединений подтверждена методом ЯМР ^1H -спектроскопии и / или методом ВЭЖХ-МС низкого разрешения. Для целевых соединений получены спектры ЯМР ^1H , ЯМР ^{13}C , ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Данные анализа промежуточных соединений представлены в табл., целевых соединений – в табл.

Спектры ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C растворов исследуемых соединений в d_6 -ДМСО, CDCl_3 и D_2O записаны на спектрометре Bruker AM-300 (300.13 МГц), внутренний стандарт – тетраметилсилан.

Спектры ВЭЖХ-МС низкого разрешения получены на полупрепаративном хроматографе Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantiva. Метод ионизации – ESI (электрораспылительная ионизация при атмосферном давлении), регистрация положительных и отрицательных ионов. Параметры хроматографической колонки: сорбент – C18, длина – 150 мм, диаметр – 2,1 мм, размер частиц сорбента – 5 мкм, подвижная фаза – вода, ацетонитрил, 1 % раствор муравьиной кислоты в воде, градиентное элюирование, температура колонки – 35°C, скорость потока – 0,25 мл/мин.

Спектры ВЭЖХ-МС высокого разрешения получены на хроматографе Ultimate 3000RS с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения QExactive. Метод ионизации – ESI (электрораспылительная ионизация при атмосферном давлении), регистрация положительных и отрицательных ионов. Параметры хроматографической колонки: сорбент – C18, длина – 150 мм, диаметр – 2,1 мм, размер частиц сорбента – 3 мкм, подвижная фаза – 0,1% раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил / вода (95:5) и 0,1% раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил / вода (5:95), градиентное элюирование, температура колонки – 35°C, скорость потока – 0,5 мл/мин.

3.1.1 Синтез β -агонистов со структурой 2-амино-1-арилэтанолов

3.1.1.1 Синтез кленбутерола, кленпроперола, кленпентерола

Синтез 4-амино-3,5-дихлорацетофенона (2)

Реакция получения 4-амино-3,5-дихлорацетофенона (2) представлена на рисунке 3.1.

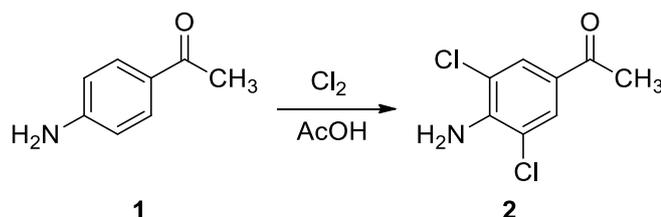


Рисунок 3.1 – Реакция получения 4-амино-3,5-дихлорацетофенона (2)

К охлажденному до 12°C раствору 40,0 г (300 ммоль) 4-аминоацетофенона (1) в 500 мл уксусной кислоты быстро прибавляли раствор 40,0 г (560 ммоль) хлора в 500 мл уксусной кислоты. При этом раствор разогревался до 30 °С. Реакционную массу сразу разбавляли 2 л ледяной воды, отфильтровывали выпавший осадок и перекристаллизовывали из 250 мл этанола. Получали 21,0 г (36 %) 4-амино-3,5-дихлорацетофенона (2) в виде белых кристаллов с т. пл. 150 – 152°C. ¹H ЯМР-спектр, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 2.50 (с, 3H, CH₃), 4.93 (уш.с, 2H, NH₂), 7.82 (с, 2H, 2CHаром).

Синтез 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (3)

Реакция получения 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (3) представлена на рисунке 3.2.

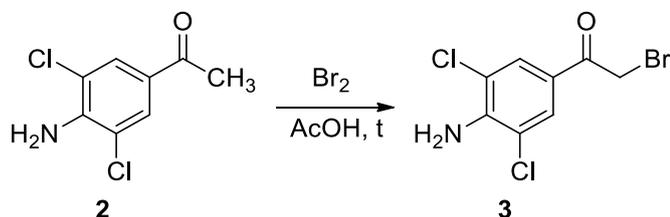


Рисунок 3.2 – Реакция получения 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (3)

Суспензию 42,0 г (200 ммоль) 4-амино-3,5-дихлорацетофенона (2) в 100 мл уксусной кислоты нагревали до 60 °С и прибавляли при перемешивании 11,2 мл (33,6 г, 210 ммоль) брома в один прием. После обесцвечивания брома и выпадения осадка (около 1 мин) реакционную массу перемешивали в течение 10 мин при 70 °С, охлаждали

и отфильтровывали. Осадок промывали 20 мл уксусной кислоты и перемешивали в течение 30 мин с раствором 55,0 г (400 ммоль) карбоната калия в 500 мл воды. Осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из 500 мл изопропанола. Получали 35,0 г (62 %) 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (**3**) в виде белых кристаллов. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 4.31 (с, 2H, CH_2), 5.05 (уш.с, 2H, NH_2), 7.83 (с, 2H, 2СНаром).

Синтез гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(изопропиламино)ацетофенона (4а), гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(трет-бутиламино)ацетофенона (4б) и гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(трет-пентиламино)ацетофенона (4в). Общая методика.

Реакция получения гидрохлоридов 4-амино-3,5-дихлор-2'-(алкиламино)ацетофенонов (**4а-в**) представлена на рисунке 3.3.

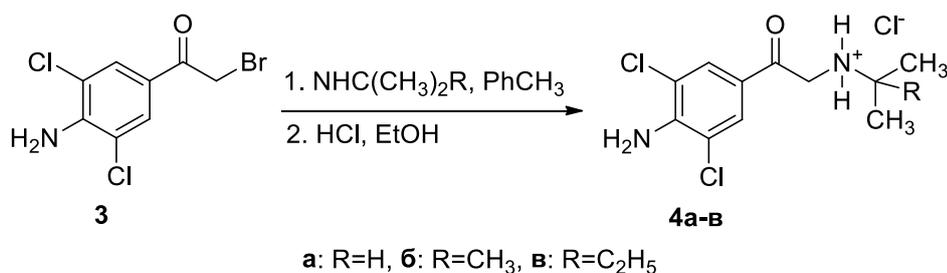


Рисунок 3.3 – Реакция получения гидрохлоридов 4-амино-3,5-дихлор-2'-(алкиламино)ацетофенонов (**4а-в**)

К суспензии 17,5 г (62 ммоль) 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (**3**) в 450 мл толуола прибавляли 12,3 мл (8,9 г, 150 ммоль) изопропиламина или 16,1 мл (11,0 г, 150 ммоль) трет-бутиламина, или 18,6 мл (13,05 г, 150 ммоль) трет-пентиламина и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, от фильтрата отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса, остаток растворяли в 200 мл эфира и прибавляли к нему 11,0 мл (66 ммоль) 6 М раствора хлористого водорода в этаноле. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (3 x 50 мл), ацетонитрилом (3 x 50 мл) и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получали 4,8 г (26 %) гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(изопропиламино)ацетофенона (**4а**) или 5,0 г (26 %) гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(трет-бутиламино)ацетофенона (**4б**), или 5,5 г (27 %) гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(трет-пентиламино)ацетофенона (**4в**) в виде желтого порошка. ^1H ЯМР-спектр **4а**, ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.18 (д, 6H, 2CH_3 , $J=6.4$), 3.24 (м, 1H, CH), 5.50 (с, 2H,

CH₂N), 6.78 (уш.с, 1H, NH), 7.92 (с, 2H, 2СНаром), 8.05 (уш.с, 2H, NH₂). ¹H ЯМР-спектр **4б**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.11 (с, 9H, 3CH₃), 4.14 (с, 2H, CH₂N), 4.99 (уш.с, 1H, NH), 5.59 (уш.с, 2H, NH₂), 7.84 (д, 2H, 2СНаром, J=1.92). ¹H ЯМР-спектр **4в**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.15-1.26 (м, 11H, *трет*-пентил), 5.52 (с, 2H, CH₂N), 6.47 (уш.с, 1H, NH), 7.90 (с, 2H, 2СНаром), 7.98 (уш.с, 2H, NH₂).

**Синтез гидрохлорида 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(изопропиламино)этанола (кленпроперола, 5а), гидрохлорида 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(трет-бутиламино)этанола (кленбутерола, 5б) и гидрохлорида 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(трет-пентиламино)этанола (кленпентерола, 5в).
Общая методика.**

Реакция получения гидрохлоридов 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов (кленпроперола (**5а**), кленбутерола (**5б**), кленпентерола (**5в**)) представлена на рисунке 3.4.

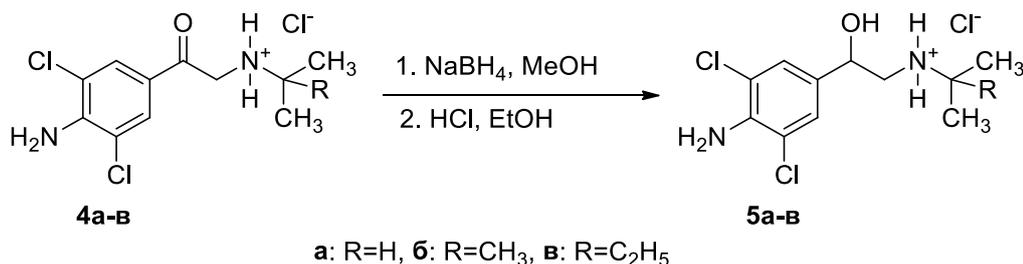


Рисунок 3.4 – Реакция получения гидрохлоридов 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов (кленпроперола (**5а**), кленбутерола (**5б**), кленпентерола (**5в**))

К раствору 5,1 г (17 ммоль) гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(изопропиламино)ацетофенона (**4а**) или 5,3 г (17 ммоль) гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(*трет*-бутиламино)ацетофенона (**4б**), или 5,5 г (17 ммоль) гидрохлорида 4-амино-3,5-дихлор-2'-(*трет*-пентиламино)ацетофенона (**4в**) в 50 мл метанола при 0-5°С прибавляли порциями при перемешивании в течение 15 мин 0,7 г (17 ммоль) борогидрида натрия. Реакционную массу перемешивали в течение 2 ч, растворитель удаляли в вакууме водоструйного насоса, к остатку прибавляли 50 мл воды и экстрагировали хлороформом (3 x 20 мл). Экстракт сушили над сульфатом магния, растворитель удаляли на РПИ в вакууме водоструйного насоса и очищали остаток методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ / метанол (10:1). Полученный после хроматографической очистки маслообразный продукт растворяли в 5 мл

метанола, прибавляли к раствору 2,9 мл (17 ммоль) 6 М раствора хлористого водорода в этаноле и высаживали гидрохлорид прибавлением 50 мл эфира. Получали 0,6 г (13 %) гидрохлорида 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(изопропиламино)этанола (кленпроперола, **5а**) в виде порошка белого цвета с т. пл. 190-192°C (с разложением), ср. лит [11] т. пл. 193-193,5°C, или 0,6 г (15 %) гидрохлорида 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (кленбутерола, **5б**) в виде порошка белого цвета с т. пл. 173-174°C (с разложением), ср. лит [11] т. пл. 174-175,5°C или 0,7 г (15 %) гидрохлорида 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанола (кленпентерола, **5в**) в виде белых кристаллов с т. пл. 203-204°C (с разложением), ср. лит [11] т. пл. 174-175,5°C. ¹H ЯМР-спектр **5а**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.24 (д, 3H, CH₃, J=6.54), 1.26 (д, 3H, CH₃, J=6.54), 2.95-3.07 (м, 2H, CH₂), 3.31 (с, 1H, CH, J=6.50), 4.86 (д,д, 1H, CHO, J=12.78, J=6.70), 5.63 (уш.с, 2H, NH₂), 7.28 (с, 2H, CHаром), 8.54 (уш.с, 1H, NH). ¹H ЯМР-спектр **5б**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 0.98 (с, 9H, (CH₃)₃), 1.41 (уш.с, 1H, OH), 2.59 (д, 2H, CH₂, J=6.8), 4.38 (т, 1H, CHO, J=6.7), 5.15 (уш.с, 1H, NH), 5.93 (с, 2H, NH₂), 6.98 (с, 2H, 2CHаром). ¹H ЯМР-спектр **5в**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 0.88 (т, 3H, CH₃, J=7.5), 1.27 - 1.25 (с, 6H, (CH₃)₂), 1.68 (кв, 2H, CH₂, J=7.4), 2.90 - 3.03 (м, 2H, CH₂), 4.86 (д, 1H, CHO, J=9.7), 5.51 (с, 2H, NH₂), 6.16 (д, 1H, OH, J=3.8), 7.30 (с, 2H, CHаром), 8.39 (т, 1H, NH, J=9.7). ¹³C ЯМР-спектр **5а**, (d₆-DMSO, м.д.): 18.58 (CH₃), 19.20 (CH₃), 50.28 (CH(CH₃)₂), 50.81 (CH₂), 67.77 (CHO), 118.34 (2C^{3,5}), 126.22 (2CH^{2,6}), 131.05 (C¹), 141.08 (C⁴). ¹³C ЯМР-спектр **5б**, (d₆-DMSO, м.д.): 29.29 (3CH₃), 51.02 (C(CH₃)₃), 52.70 (CH₂), 71.41 (CHO), 116.49 (2C^{3,5}), 127.98 (2CH^{2,6}), 136.42 (C¹), 136.00 (C⁴). ¹³C ЯМР-спектр **5в**, (d₆-DMSO, м.д.): 8.38 (CH₃), 22.37 (CH₃), 22.46 (CH₃), 30.24 (CH₂), 48.31 (CH₂), 59.93 (C(CH₃)₃), 68.02 (CHO), 118.31 (2C^{3,5}), 126.29 (2CH^{2,6}), 131.02 (C¹), 141.07 (C⁴). Масс-спектр (ESI) **5а**, m/z: 263.0717 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 263.0712 [M+H]⁺. Масс-спектр (ESI) **5б**, m/z: 277.0869 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 277.0868 [M+H]⁺. Масс-спектр (ESI) **5в**, m/z: 291.1028 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 291.1025 [M+H]⁺.

3.1.1.2 Синтез бромбутерола

Синтез 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона (**6**)

Реакция получения 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона (**6**) представлена на рисунке 3.5.

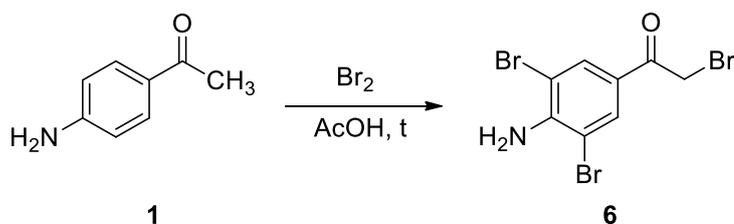


Рисунок 3.5 – Реакция получения 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона (6)

К раствору 18,0 г (133 ммоль) 4-аминоацетофенона (1) в 250 мл ледяной уксусной кислоты при интенсивном перемешивании в течение 5 мин прибавляли 13,8 мл (42,7 г, 267 ммоль) брома, поддерживая температуру реакционной массы не выше 60°C и перемешивали в течение 30 мин. Выпавший осадок отфильтровывали и сразу же добавляли порциями к перемешиваемому раствору 50,0 г (403 ммоль) карбоната калия в 500 мл воды. После добавления смесь перемешивали в течение 10 мин, осадок отфильтровывали, промывали его водой (2 x 300 мл), затем охлажденным метанолом (3 x 80 мл) и высушивали на воздухе. Получали 20,0 г (40 % в расчете на кетон и 61 % - на бром) 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона (6) с т. пл. 149-151°C, ср. лит [16] т. пл. 147-150°C. R_f 0.82 (хлороформ). ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 4.31 (с, 2H, NH_2), 5.18 (с, 2H, CH_2), 8.03 (с, 2H, 2СНаром).

Синтез гидрохлорида 4-амино-3,5-дибром-2'-(*трет*-бутиламино)ацетофенона (7)

Реакция получения 4-амино-3,5-дибром-2'-(*трет*-бутиламино)ацетофенона (7) представлена на рисунке 3.6.

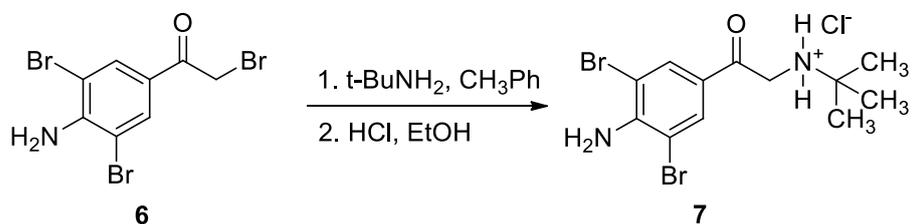


Рисунок 3.6 – Реакция получения 4-амино-3,5-дибром-2'-(*трет*-бутиламино)ацетофенона (7)

К суспензии 19,7 г (53 ммоль) 4-амино-2',3,5-трибромацетофенона (6) в 400 мл толуола при интенсивном перемешивании прибавляли 9,0 г (123 ммоль) *трет*-бутиламина и перемешивали в течение 18 ч, образовавшийся осадок отфильтровывали. К фильтрату при интенсивном перемешивании добавляли 14,0 мл (78 ммоль) 5,6 М

раствора хлористого водорода в абсолютном этаноле, перемешивали в течение 10 мин, выпавший осадок отфильтровывали, промывали последовательно 100 мл толуола, сухим ацетонитрилом (2 x 100 мл), 100 мл толуола и гексаном (2 x 100 мл). Осадок высушивали, тщательно промывали холодной водой (2 x 75 мл) и высушивали на воздухе. Получали 4,9 г (23 %) гидрохлорида 4-амино-3,5-дибром-2'-(*трет*-бутиламино)ацетофенона (**7**). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.35 (с, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 4.55 (с, 2H, NH_2), 6.45 (с, 2H, CH_2), 8.16 (с, 2H, 2 CHаром), 8.98 (с, 2H, $t\text{-BuNH}_2$).

Синтез 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (бромбутерола, **8**)

Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (бромбутерола, **8**) представлена на рисунке 3.7.

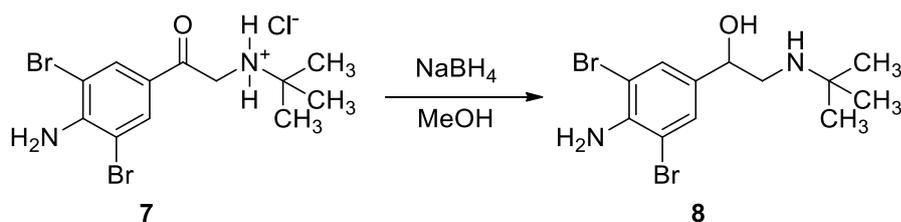


Рисунок 3.7 – Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (бромбутерола, **8**)

К суспензии 1,4 г (36 ммоль) борогидрида натрия в 100 мл метанола при перемешивании порциями в течение 5-10 мин прибавляли 4,9 г (12 ммоль) гидрохлорида 4-амино-3,5-дибром-2'-(*трет*-бутиламино)ацетофенона (**7**), перемешивали в течение 10 мин и добавляли еще 0,5 г (12 ммоль) борогидрида натрия, перемешивали в течение 18 ч. От реакционной массы отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 50 мл воды, осадок отфильтровывали, промывали водой (4 x 50 мл), высушивали на воздухе и очищали методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ / метанол (5:1). Получали 0,5 г (11 %) 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (бромбутерола, **8**) в виде белых кристаллов с т. пл. 121-123°C. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.00 (с, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 2.54 (д, 2H, CH_2N , $J=5.9$), 3.30 (уш. с, 2H, OH и NH), 4.38 (т, 1H, CHO , $J=5.9$), 5.20 (с, 2H, NH_2), 7.38 (2H, 2 CHаром). ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.11 (с, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 2.49 (уш. с, 2H, OH и NH), 2.52 (д,д, 1H, CH_2N , $J=11.7$, 8.9), 2.85 (д,д, 1H, CH_2N , $J=12.1$, 3.2), 4.45 (д,д, 1H,

CHO, $J=8.5, 3.2$), 4.50 (с, 2H, NH₂), 7.39 (2H, 2CHаром). ¹³C ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д.): 29.38 (3CH₃), 40.53 (C¹), 50.03 (C(CH₃)₃), 50.82 (CH₂), 71.51 (CHO), 107.83 (2C^{3,5}), 129.97 (2CH^{2,6}), 135.90 (C¹), 141.89 (C⁴). Масс-спектр (ESI), m/z: 367.0999 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 367.0995 [M+H]⁺.

3.1.1.3 Синтез тулобутерола

Синтез 2-(2-хлорфенил)оксирана (10)

Реакция получения 2-(2-хлорфенил)оксирана (10) представлена на рисунке 3.8.

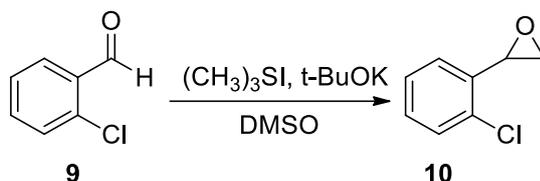


Рисунок 3.8 – Реакция получения 2-(2-хлорфенил)оксирана (10)

К смеси 5,6 мл (7,0 г, 50 ммоль) 2-хлорбензальдегида (9) и 14,2 г (70 ммоль) йодида триметилсульфония в 30 мл ДМСО прибавляли по каплям при температуре не выше 10 °С раствор 7,0 г (62 ммоль) *трет*-бутилата калия в 30 мл ДМСО, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К реакционной массе при температуре не выше 10 °С прибавляли по каплям 150 мл воды, экстрагировали диэтиловым эфиром (3 x 30 мл), объединенные органические фазы промывали водой, сушили над сульфатом магния, упаривали растворитель в вакууме водоструйного насоса, остаток перегоняли в вакууме водоструйного насоса, собирая фракцию с т. кип. 98-102 °С / 20мм.рт.ст. Получали 2,0 г (26 %) 2-(2-хлорфенил)оксирана (10), представляющего собой желтоватое масло. ¹H ЯМР-спектр, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 2.67 (д.д, 1H, CH₂, $J=5.5, 2.6$), 3.20 (д.д, 1H, CH₂, $J=5.5, 4.0$), 4.22 (м, 1H, CH), 7.18-7.28 (м, 3H, CHаром), 7.36 (д.д, 1H, CHаром, $J=5.1, 2.9$).

Синтез гидрохлорида 1-(2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (тулобутерола, 11)

Реакция получения гидрохлорида 1-(2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (тулобутерола, 11) представлена на рисунке 3.9.

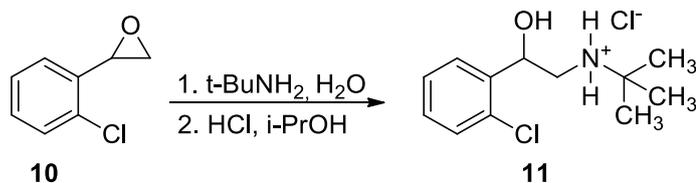


Рисунок 3.9 – Реакция получения гидрохлорида 1-(2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанол (тулобутерола, **11**)

К 2,1 г (13,5 ммоль) 2-(2-хлорфенил)оксирана (**10**) в 5,5 мл воды добавляли 1,9 мл (1,3 г, 17,5 ммоль) *трет*-бутиламина и перемешивали реакционную массу при комнатной температуре в течение 48 ч, добавляли 5,5 мл воды и экстрагировали диэтиловым эфиром (2 x 20 мл), сушили над сульфатом магния и упаривали растворитель в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищали методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ. Получали 1,8 г (59 %) 1-(2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанол в виде кристаллов белого цвета с т. пл. 89-91°C, R_f 0.1 (хлороформ), ср. лит. [19] т. пл. 89-90°C. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.10 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.47 (д.д, 1H, CH_2 , $J=12.5$, 8.8), 3.13 (уш.с, 2H, NH, OH), 3.05 (д.д, 1H, CH_2 , $J=12.1$, 3.3), 5.01 (д.д, 1H, CH, $J=8.4$, 3.3), 7.25 (д.д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=7.3$, 1.5), 7.28-7.40 (м, 2H, $2\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.64 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.8$)

К раствору 1,8 г (8 ммоль) 1-(2-хлорфенил)-2-*трет*-бутиламиноэтанол в 30 мл диэтилового эфира добавляли 0,93 мл (8 ммоль) 8,5 М раствора хлороводорода в изопропанол, выпавший осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получали 1,9 г (91 %) гидрохлорида 1-(2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанол (тулобутерола, **11**) с т. пл. 165-167°C. ^1H ЯМР-спектр, ($d_6\text{-DMSO}$, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.31 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.70 (д, 1H, CH_2 , $J=12.3$), 3.07 (д, 1H, CH_2 , $J=12.4$), 5.31 (д, 1H, CH, $J=10.1$), 6.37 (с, 1H, OH), 7.37 (д.д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=7.3$, 1.5), 7.41-7.49 (м, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.69 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.8$), 8.64 (уш.с, 1H, NH), 9.20 (уш.с, 1H, NH). ^{13}C ЯМР-спектр, ($d_6\text{-DMSO}$, м.д.): 25.4 (CH_3), 47.1 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 57.0 (CH_2), 66.3 (CHON), 128.0 ($\text{C}^{4,5}$), 128.5 (C^3), 129.7 (C^6), 131.4 (C^2), 139.5 (C^1). Масс-спектр (ESI), m/z : 228.7353 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 228.7378 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.3.4 Синтез 4-гидрокситулобутерола, метаболита тулобутерола

Синтез 4-гидрокси-2-хлорбензальдегида (**13**)

Реакция получения 4-гидрокси-2-хлорбензальдегида (**13**) представлена на рисунке 3.10.

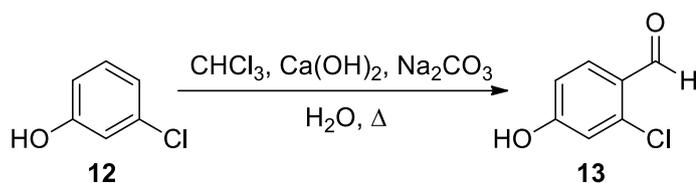


Рисунок 3.10 – Реакция получения 4-гидрокси-2-хлорбензальдегида (**13**)

К интенсивно перемешиваемой нагретой до 95 °С смеси 50,6 г (900 ммоль) гидроксида кальция, 80,0 г (750 ммоль) карбоната натрия, 28,0 г (220 ммоль) 3-хлорфенола (**12**) и 540 мл воды, прибавляли по каплям под слой жидкости 35,0 мл (51,8 г, 430 ммоль) хлороформа в течение 30 мин и кипятили в течение 6 ч. Из реакционной массы отгоняли с водяным паром дистиллят, содержащий побочный 2-гидрокси-4-хлорбензальдегид. Остаток отфильтровывали, декантировали раствор от смолоподобного тяжелого масла, подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH=5 и охлаждали. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Получали 2,1 г (6 %) 4-гидрокси-2-хлорбензальдегида (**13**) в виде светло-бежевых игольчатых кристаллов с т.пл. 141-142 °С, ср. лит. [159] т.пл. 146-147 °С. R_f 0.62 (хлороформ / метанол, 10:1), серое пятно после опрыскивания раствором хлорида железа (III) в метаноле. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 6.94 (д, 1H, CНаром, $J^3=8.1$), 6.99 (с, 1H, CНаром), 7.75 (д, 1H, CНаром, $J^3=8.8$), 10.15 (с, 1H, CHO), 11.28 (уш.с, 1H, OH).

Синтез 4-бензилокси-2-хлорбензальдегида (**14**)

Реакция получения 4-бензилокси-2-хлорбензальдегида (**14**) представлена на рисунке 3.11.

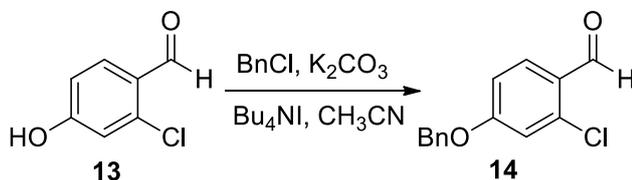


Рисунок 3.11 – Реакция получения 4-бензилокси-2-хлорбензальдегида (**14**)

К перемешиваемой смеси 2,0 г (13 ммоль) 4-гидрокси-2-хлорбензальдегида (**13**), 3,4 г (25 ммоль) карбоната калия, 2,0 г (5 ммоль) бензилтриэтиламмоний хлорида в 80 мл сухого ацетонитрила, прибавляли по каплям 1,1 мл (1,2 г, 19 ммоль) бензилхлорида и оставляли на ночь. Реакционную массу фильтровали, фильтрат упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса, экстрагировали этилацетатом и

получали 1,8 г технического 4-(бензилокси)-2-хлорбензальдегида. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент: хлороформ / метанол, 10:1. Получали 1,7 г (53 %) 4-бензилокси-2-хлорбензальдегида (**14**) в виде белых кристаллов с т.пл. 71-72 °С, ср. лит. [187] т.пл. 68-69 °С. R_f 0.70 (хлороформ / метанол, 10:1), оранжевое пятно после опрыскивания раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 5.28 (с, 2H, CH_2O), 7.18 (д.д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J^3=8.8$, $J^4=2.2$), 7.30 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J^4=2.2$), 7.33-7.57 (м, 5H, $5\text{C}_{\text{Hаром}}$), 7.86 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J^3=8.8$), 10.21 (с, 1H, CHO).

Синтез 2-(4-бензилокси-2-хлорфенил)оксирана (**15**)

Реакция получения 2-(4-бензилокси-2-хлорфенил)оксирана (**15**) представлена на рисунке 3.12.

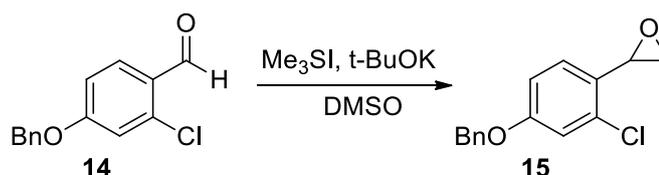


Рисунок 3.12 – Реакция получения 2-(4-бензилокси-2-хлорфенил)оксирана (**15**)

К смеси 1,7 г (7 ммоль) 4-бензилокси-2-хлорбензальдегида (**14**) и 1,9 г (9 ммоль) йодида триметилсульфония в 5 мл ДМСО прибавляли по каплям при температуре не выше 10 °С раствор 1,0 г (8 ммоль) *трет*-бутилата калия в 5 мл ДМСО, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К реакционной массе при температуре не выше 10 °С прибавляли по каплям 20 мл воды, экстрагировали диэтиловым эфиром (3 x 5 мл), объединенные органические фазы промывали водой, расслолом, сушили над сульфатом магния, упаривали растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Получали 1,5 г (93 %) 2-(4-бензилокси-2-хлорфенил)оксирана (**15**), с т.пл. 39-40 °С. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.74 (д.д, 1H, CH_2O , $J^2=5.1$, $J^3=2.9$), 3.11 (т, 1H, CH_2O , $J^2=5.1$), 4.05 (т, 1H, CHO , $J^3=2.9$), 5.11 (с, 2H, CH_2O), 6.97 (д.д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J^3=8.8$, $J^4=2.2$), 7.10 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J^3=8.8$), 7.13 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J^4=2.2$), 7.27-7.45 (м, 5H, $5\text{C}_{\text{Hаром}}$).

Синтез 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**16**)

Реакция получения 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**16**) представлена на рисунке 3.13.

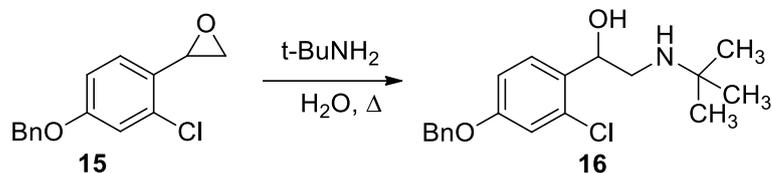


Рисунок 3.13 – Реакция получения 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**16**)

К смеси 3,5 мл (2,45 г, 34 ммоль) *трет*-бутиламина и 3 мл воды добавляли порциями в течение 30 мин 1,5 г (6 ммоль) 2-[4-(бензилокси)-2-хлорфенил]оксирана (**15**) и перемешивали реакционную массу при кипячении в течение 3 ч, охлаждали и оставляли на ночь. Выпавший осадок отфильтровывали, высушивали в вакуумированном эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали 1,7 г технического 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола, который очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент: хлороформ / метанол, 10:1. Получали 0,9 г (48 %) 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**16**) в виде белых кристаллов с т.пл. 89-91°C. R_f 0.38 (хлороформ / метанол, 10:1), оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.03 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.44 (д, 1H, CH_2N , $J^2=10.2$), 2.64 (д, 1H, CH_2N , $J^2=11.0$), 4.81 (д, 1H, CHO , $J=6.7$), 5.13 (с, 2H, CH_2O), 5.36 (уш.с, 1H, NH), 7.02 (д,д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J^3=8.1$, $J^4=2.2$), 7.06 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J^4=2.2$), 7.32-7.54 (м, 6H, $6\text{CH}_{\text{аром}}$).

Синтез 2-(*трет*-бутиламино)-1-(2-хлорфенил)этанола (4-гидрокситулобутерола, **17**)

Реакция получения 2-(*трет*-бутиламино)-1-(2-хлорфенил)этанола (4-гидрокситулобутерола, **17**) представлена на рисунке 3.14.

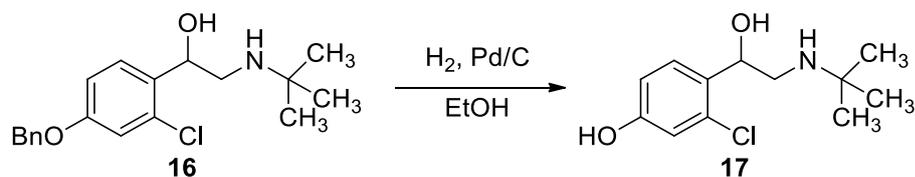


Рисунок 3.14 – Реакция получения 2-(*трет*-бутиламино)-1-(2-хлорфенил)этанола (4-гидрокситулобутерола, **17**)

К раствору 0,6 г (1,7 ммоль) 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**16**) в 30 мл этанола добавляли 0,1 г 5 %-ного палладия на активированном угле и гидрировали в стальном автоклаве при комнатной температуре и давлении 1 атм в течение 30 мин. Далее реакционную массу фильтровали через слой целлита, растворитель упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 0,4 г технического 2-(*трет*-бутиламино)-1-(2-хлорфенил)этанола, который очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент: хлороформ / метанол / 25 %-ный водный аммиак, 70:10:1. Получали 0,15 г (35 %) 2-(*трет*-бутиламино)-1-(2-хлорфенил)этанола (4-гидрокситулобутерола, **17**) в виде светло-желтых кристаллов с т.пл. 79-80 °С. R_f 0.33 (хлороформ / метанол / 25 %-ный водный аммиак, 70:10:1), желтое пятно после проявления в йодной камере. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.03 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.44 (д,д, 1H, CH_2N , $J^2=11.7$, $J^3=11.7$, $J^3=8.8$), 2.61 (д,д, 1H, CH_2N , $J^2=11.7$, $J^3=2.9$), 3.35 (уш.с, 2H, NH и OH), 4.78 (д,д, 1H, CHO , $J^3=8.8$, $J^3=2.9$), 6.70-6.80 (м, 2H, 2 $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.37 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J^3=9.5$). ^{13}C ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д.): 29.4 (CH_3), 49.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 50.1 (CH_2), 69.6 (CHOH), 114.9 (C^5), 115.7 (C^6), 128.9 (C^3), 131.4 (C^2), 132.4 (C^1), 157.4 (C^4). Масс-спектр (ESI), m/z : 244.7368 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 244.7372 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.1.5 Синтез циматерола и цимбутерола

Синтез 4-амино-3-йодацетофенона (**18**)

Реакция получения 4-амино-3-йодацетофенона (**18**) представлена на рисунке 3.15.

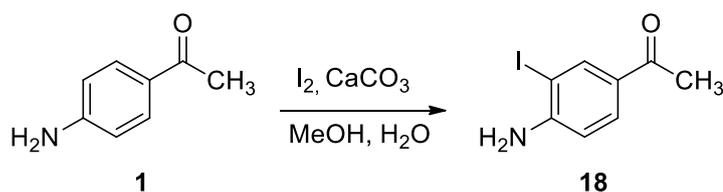


Рисунок 3.15 – Реакция получения 4-амино-3-йодацетофенона (**18**)

В 800 мл метанола и 200 мл воды суспендировали 40,0 г (300 ммоль) 4-аминоацетофенона (**1**), 150,0 г (600 ммоль) йода и 59,4 г (600 ммоль) карбоната кальция и перемешивали при комнатной температуре в течение 80 ч. По завершении реакции к реакционной массе прибавляли 250 мл 60 % раствора тиосульфата натрия, перемешивали, фильтровали и упаривали спирт в вакууме водоструйного насоса. Остаток после упаривания экстрагировали хлороформом (3 x 150 мл), экстракт

промывали водой (2 x 200 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали. Получали 54,0 г (70 %) 4-амино-3-йодацетофенона (**18**) в виде оранжевого масла. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.42 (с, 3H, CH_3), 6.00 (уш.с, 2H, NH_2), 6.88 (д.д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=0.47$, $J=8.52$), 7.50 (д.д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=2.04$, $J=8.53$), 8.11 (д.д., 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=0.49$, $J=2.00$). Масс-спектр (ESI), m/z : 262.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 262.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 4-амино-3-цианоацетофенона (**19**)

Реакция получения 4-амино-3-цианоацетофенона (**19**) представлена на рисунке 3.16.

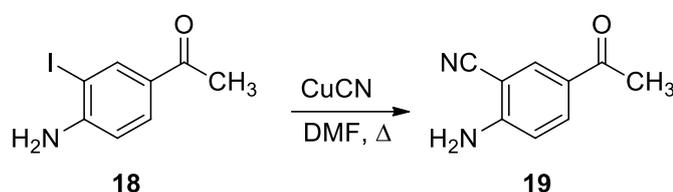


Рисунок 3.16 – Реакция получения 4-амино-3-цианоацетофенона (**18**)

Раствор 20,0 г (76 ммоль) 4-амино-3-йодацетофенона (**18**) и 14,0 г (156 ммоль) цианида меди в 150 мл диметилформамида кипятили в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до 100 °С и выливали в 500 мл воды. Полученный раствор фильтровали, осадок промывали 100 мл этилацетата и экстрагировали фильтрат этилацетатом (3 x 150 мл). Объединенные органические фазы промывали водой (3 x 250 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали. Полученный остаток затирали с небольшим количеством этанола, фильтровали и высушивали полученные кристаллы в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали 4,9 г (40 %) 4-амино-3-цианоацетофенона (**19**) в виде желтых кристаллов с т. пл. 150-152 °С. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.61 (с, 3H, CH_3), 5.92 (уш.с, 2H, NH_2), 6.88 (д.д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=0.73$, $J=8.30$), 7.66 (д.д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=2.04$, $J=8.33$), 8.19 (д.д, 1H, dd, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=0.49$, $J=2.00$). Масс-спектр (ESI), m/z : 161.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 161.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**)

Реакция получения 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**) представлена на рисунке 3.17.

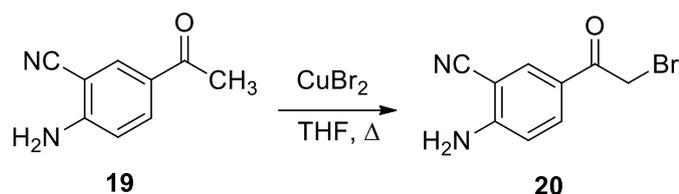


Рисунок 3.17 – Реакция получения 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**)

Смесь 5,0 г (31 ммоль) 4-амино-3-цианоацетофенона (**19**) и 13,5 г (56 ммоль) дибромида меди в 150 мл тетрагидрофурана кипятили в течение 4 ч. Реакционную массу охлаждали, фильтровали, фильтрат упаривали и затирали полученный технический продукт с небольшим количеством этанола. Кристаллический продукт отфильтровывали, промывали этанолом и высушивали в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали 6,7 г (90 %) 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**) в виде желтых кристаллов с т. пл. 160-161°C. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 4.79 (с, 2H, CH₂Br), 5.62 (уш.с, 2H, NH₂), 6.78 (д.д, 1H, C_Hаром J=0.77, J=8.38), 7.66 (д.д, 1H, C_Hаром, J=2.09, J=8.36), 8.19 (д.д, 1H, C_Hаром, J=0.52, J=2.11). Масс-спектр (ESI), m/z: 161.1 [M+H]⁺. Масс-спектр (ESI), m/z: 237.0 [M-H]⁻. Вычислено, m/z: 237.1 [M-H]⁻.

Синтез 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (циматерола, 21а) и 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-(трет-бутиламино)этанола (цимбутерола, 21б).
Общая методика.

Реакция получения 1-(4-амино-3-циано-фенил)-2-(алкиламино)этанолов (циматерола (**21а**), цимбутерола (**21б**)) представлена на рисунке 3.18.

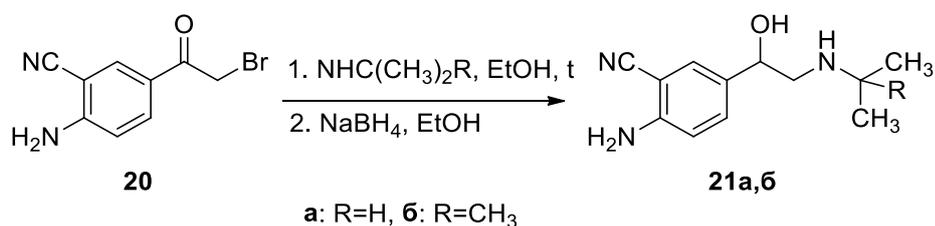


Рисунок 3.18 – Реакция получения 1-(4-амино-3-циано-фенил)-2-(алкиламино)этанолов (циматерола (**21а**), цимбутерола (**21б**))

Суспензию 2,0 г (8 ммоль) 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**) в 25 мл этилового спирта охлаждали до 0 °С и прибавляли к ней 1,4 мл (1,0 г, 17 ммоль) изопропиламина или 1,8 мл (1,2 г, 17 ммоль) трет-бутиламина. Дали нагреться реакционной массе до комнатной температуры, а затем нагревали до 50 °С и выдерживали при этой температуре 3 ч, охлаждали до комнатной температуры и

добавляли порциями 0,5 г (13 ммоль) борогидрида натрия. Реакционную массу перемешивали ночь при комнатной температуре, затем отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 30 мл воды и экстрагировали хлористым метилом (2 x 30 мл), органический слой отделяли, сушили над сульфатом магния, растворитель отгоняли в вакууме водоструйного насоса, полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ / метанол (15:1). Получали 0,3 г (15 %) 1-(4-амино-3-циано-фенил)-2-(изопропиламино)этанола (циматерола, **21a**) или 0,3 г (13 %) 1-(4-амино-3-циано-фенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (цимбутерола, **21b**) с т. пл. 185-187°C, ср. лит. [28] т. пл. 184-186°C. ¹H ЯМР-спектр **21a**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 0.94 (д, 3H, CH₃, J=6.18), 0.96 (д, 3H, CH₃, J=6.18), 2.53-2.61 (м, 2H, CH₂), 2.71 (с, 1H, CH(CH₃)₂, J=6.18), 4.43 (кв, 1H, J=4.03 Hz), 5.91 (с, 2H, NH₂), 6.76 (д, 1H, CHаром, J=8.52), 7.28 (д, 1H, CHаром, J=8.58) ¹H ЯМР-спектр **21b**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 0.99 (с, 9H, CH₃), 2.52-2.57 (м, 2H, CH₂), 4.32-4.36 (м, 1H, CH), 5.77 (уш.с, 2H, NH₂), 7.74 (д,д, 1H, CHаром, J=8.0, 1.2), 7.25-7.28 (м, 2H, CHаром). ¹³C ЯМР-спектр **21a**, (d₆-DMSO, м.д.): 23.37 (CH₃), 23.39 (CH₃), 48.36 (CH(CH₃)₂), 55.31 (CH₂), 71.20 (CHO), 93.33 (C³), 115.51 (CHаром), 118.79 (CN), 129.94 (CHаром), 132.56 (CHаром), 132.86 (C¹), 151.08 (C⁴). ¹³C ЯМР-спектр **21b**, (d₆-DMSO, м.д.): 29.36 (CH₃), 50.02 (C(CH₃)₃), 50.70 (CH₂), 71.94 (CH), 93.31 (C³), 115.49 (CHаром), 118.80 (CN), 129.98 (CHаром), 132.62 (CHаром), 132.89 (C¹), 151.09 (C⁴). Масс-спектр **21a** (ESI), m/z: 220.2209 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 220.2902 [M+H]⁺. Масс-спектр **21b** (ESI), m/z: 234.3169 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 220.3168 [M+H]⁺.

3.1.1.6 Синтез изопротеренола

Синтез 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанона (**23**)

Реакция получения 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанона (**23**) представлена на рисунке 3.19.

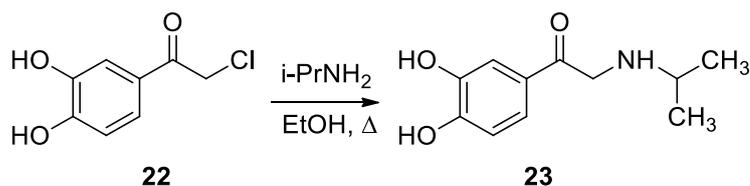


Рисунок 3.19 – Реакция получения 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанона (**23**)

К раствору 1,0 г (5 ммоль) 3,4-дигидрокси-2'-хлорацетофенона (**22**) в 10 мл этанола добавляли 8,0 мл (5,5 г, 93 ммоль) изопропиламина, кипятили реакционную массу в течение 3 ч, охлаждали, упаривали растворитель в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 20 мл ацетона, перемешивали в течение 15 мин, осадок отфильтровывали и промывали 15 мл воды, а затем 20 мл ацетона, высушивали. Получали 0,6 г (54 %) 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанона (**23**) с т. пл. 167-168°C, ср. лит. [181] т. пл. 168-169°C. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.00 (д, 6H, CH(CH₃)₂, J=6.4), 2.74 (кв, 1H, CH(CH₃)₂, J=6.4), 3.93 (с, 2H, CH₂), 4.20-5.75 (уш.с, 3H, OH, NH), 6.77 (д, 1H, CH_{аром.}, J=8.0), 7.27-7.37 (м, 2H, CH_{аром.}). Масс-спектр (ESI), m/z: 210.0 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 210.1 [M+H]⁺.

Синтез гидрохлорида 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (изопротеренола, **24**)

Реакция получения 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (изопротеренола, **24**) представлена на рисунке 3.20.

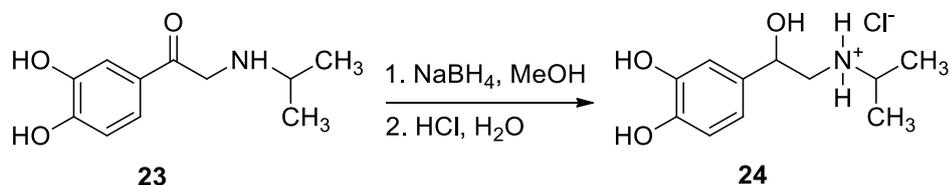


Рисунок 3.20 – Реакция получения 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (изопротеренола, **24**)

К смеси 0,6 г (3 ммоль) 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-изопропиламиноэтанона (**23**) и 25 мл метанола при 0 °С порциями добавляли 0,08 г (2 ммоль) борогидрида натрия. Перемешивали 2 ч при комнатной температуре, добавляли концентрированную соляную кислоту до pH=2, упаривали растворитель в вакууме водоструйного насоса, остаток перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Получали 0,5 г (65 %) гидрохлорида 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (изопротеренола, **24**) с т. пл. 168-172°C, ср. лит. [32] т. пл. 170-172°C. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-D₂O, м.д., J/Гц): 1.35 (д, (6H, CH₃, J=6.2), 3.27 (д, 2H, CH₂, J=8.2), 3.51 (м, 1H, CH(CH₃)₂), 4.91 (м, 1H, CH), 6.85-6.99 (м, 3H, CH_{аром.}). ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.24 (т, 6H, CH(CH₃)₂, J=6.6), 2.74 (м, 2H, CH(CH₃)₂, CH₂N), 3.31-3.35 (м, 1H, CH₂), 4.79 (д, 1H, CHO, J=9.6), 5.94 (д, 1H, OH, J=3.2), 6.63 (д, 1H, CH_{аром.}, J=7.9), 6.73 (д, 1H, CH_{аром.}, J=8.0), 6.80 (с, 1H,

СНаром), 8.48 (уш.с, 1H, NH), 8.96 (с, 1H, OH), 8.99 (1H, OH), 9.05 (уш.с, 1H, NH). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 18.56 (CH_3), 19.24 (CH_3), 50.14 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 51.42 (CH_2), 68.83 (CHO), 113.97 (C^2), 115.86 (C^5), 117.22 (C^6), 133.20 (C^1), 145.43 (C^4), 145.67 (C^3). Масс-спектр (ESI), m/z : 212.2643 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 212.2649 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.1.7 Синтез метапротеренола и тербуталина

Синтез 3,5-дибензилоксиацетофенона (26)

Реакция получения 3,5-дибензилоксиацетофенона (26) представлена на рисунке 3.21.

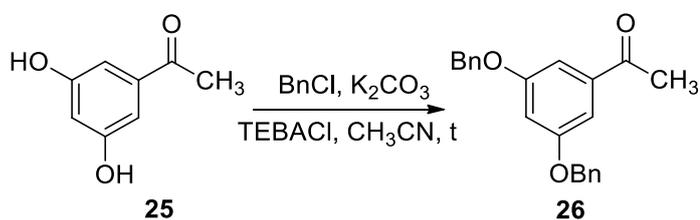


Рисунок 3.21 – Реакция получения 3,5-дибензилоксиацетофенона (26)

К перемешиваемой смеси 7,6 г (50 ммоль) 3,5-дигидроксиацетофенона (25), 27,2 г (197 ммоль) карбоната калия, 1,1 г (5 ммоль) бензилтриэтиламмоний хлорида в 250 мл сухого ацетонитрила, прибавляли по каплям 17,3 мл (19,0 г, 150 ммоль) бензилхлорида, нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 20 ч. Реакционную массу фильтровали, фильтрат упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Из остатка в вакууме водоструйного насоса отгоняли избыток бензилхлорида, а затем остаток перегоняли в вакууме масляного насоса. Получали 14,4 г (86 %) 3,5-дибензилоксиацетофенона (26) в виде вязкого желтого масла, которое при стоянии застывало в белую кристаллическую массу с т. пл. 60-61 °С, ср. лит. [43] т. пл. 60-61 °С. R_f 0.73 (хлороформ / метанол, 10:1), R_f 0.26 (толуол), оранжевое пятно после опрыскивания раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.57 (с, 3H, CH_3CO), 5.18 (с, 4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 6.97 (т.д, 1H, СНаром, $J=2.2$), 7.19 (д, 2H, 2СНаром , $J=2.2$), 7.30 (д, 1H, СНаром, $J=2.2$), 7.29-7.56 (м, 10H, 10СНаром).

Синтез 3,5-дibenзилокси-2'-бромацетофенона (27)

Реакция получения 3,5-дibenзилокси-2'-бромацетофенона (27) представлена на рисунке 3.22.

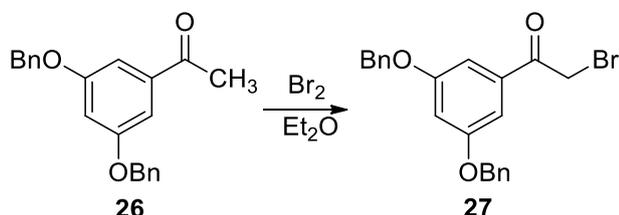


Рисунок 3.22 – Реакция получения 3,5-дibenзилокси-2'-бромацетофенона (27)

Раствор 10,0 г (30 ммоль) 3,5-дibenзилоксиацетофенона (26) в 230 мл сухого диэтилового эфира охлаждали до 0 °С в бане с ледяной водой и прибавляли по каплям раствор 5,0 г (31 ммоль) брома в 15 мл сухого хлороформа при температуре не выше 5 °С, снимали охлаждение и перемешивали в течение 2 ч. Растворитель отгоняли в вакууме водоструйного насоса, получали технический 3,5-дibenзилокси-2'-бромацетофенон в виде коричневого масла. Перекристаллизовывали остаток из метанола, получали 7,8 г (63 %) 3,5-дibenзилокси-2'-бромацетофенона (27), с т. пл. 81-82°С; ср. лит. [43] т. пл. 82-84°С. R_f 0.55 (толуол), желтое пятно после опрыскивания раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 4.77 (с, 2Н, СН₂Br), 5.17 (с, 4Н, 2СН₂О), 6.97 (с, 1Н, СНаром), 7.15 (с, 2Н, 2СНаром), 7.27-7.56 (м, 10Н, СНаром).

Синтез 1-(3,5-дibenзилоксифенил)-2-бромэтанола (28)

Реакция получения 1-(3,5-дibenзилоксифенил)-2-бромэтанола (28) представлена на рисунке 3.23.

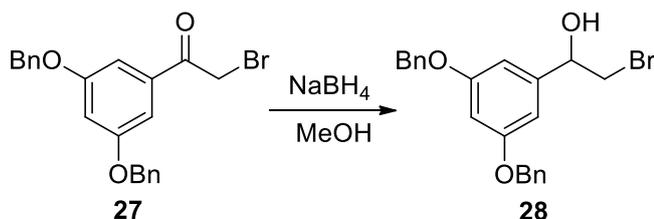


Рисунок 3.23 – Реакция получения 1-(3,5-дibenзилоксифенил)-2-бромэтанола (28)

Суспензию 1,0 г (2 ммоль) 3,5-дибензилокси-2'-бромацетофенона (**27**) в 70 мл метанола охлаждали до 0 °С в бане с ледяной водой и присыпали порциями (x 10) 0,1 г (2 ммоль) боргидрида натрия в течение 10 мин, перемешивали реакционную массу в течение 1 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали охлажденным метанолом (4 x 2 мл). Получали 0,6 г (59 %) 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-бромэтанола (**28**), с т. пл. 107-108°С. R_f 0.17 (толуол), окрашивался после выдерживания в йодной камере.

Фильтрат упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 40 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали охлажденным метанолом (3 x 2 мл), осадок высушивали на воздухе. Получали добавочно 0,3 г (31 %) 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-бромэтанола (**28**), с т. пл. 103-105°С. Суммарный выход 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-бромэтанола (**28**) составил 90 %. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 3.56 (д.д, 1H, 1CH₂Br, $J=10.3$, $J=7.3$), 3.68 (д.д, 1H, 1CH₂Br, $J=10.3$, $J=4.4$), 4.67-4.80 (м, 1H, 1CHO), 5.09 (с, 4H, 2CH₂O), 5.81 (д, 1H, OH, $J=4.4$), 6.60 (с, 1H, 1CHаром), 6.70 (с, 2H, 2CHаром), 7.27 -7.55 (м, 10H, 10CHаром).

Синтез 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (**29а**) и 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**29б**). Общая методика.

Реакция получения 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(алкиламино)этанола (**29а,б**) представлена на рисунке 3.24.

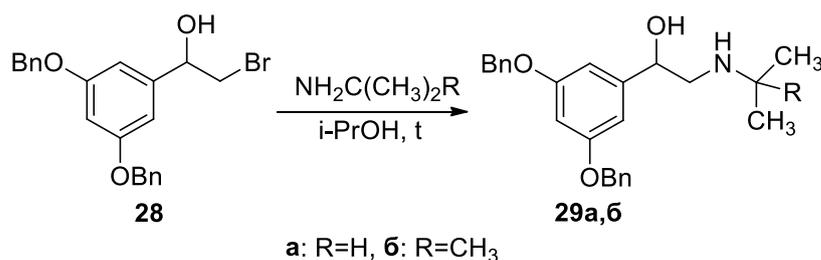


Рисунок 3.24 – Реакция получения 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(алкиламино)этанола (**29а,б**)

К раствору 0,3 г (1 ммоль) 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-бромэтанола (**28**) в 6,5 мл изопропанола добавляли 0,7 мл (0,5 г, 8 ммоль) изопропиламина или 0,8 мл (0,6 г, 8 ммоль) *трет*-бутиламина и перемешивали реакционную массу при кипячении в течение 8 ч. Затем охлаждали реакционную массу в бане с ледяной водой, выпавший осадок отфильтровывали, промывали изопропанолом (3 x 1 мл), высушивали на воздухе. Получали 0,2 г (66 %) 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (**29а**) в

виде белых кристаллов, с т. пл. 120-121°C. R_f 0.19 (хлороформ / метанол, 10:1), оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. Получали 0,3 г (63 %) 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**29б**) в виде белых кристаллов с т. пл. 119-120°C, ср. лит. [43] т. пл. 119-122°C. R_f 0.26 (хлороформ / метанол, 10:1), оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа.

1-(3,5-Дибензилоксифенил)-2-(изопропиламино)этанол (**29а**) дополнительно перекристаллизовывали из 7 мл смеси этанол / диэтиловый эфир (1:1). Выход 0,1 г (36 %), белые кристаллы, с т. пл. 123-124°C. R_f 0.19 (хлороформ / метанол, 10:1). ^1H ЯМР-спектр **29а**, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 0.97 (т, 6H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$, $J=5.9$), 2.56 (т.д, 1H, $\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$, $J=4.7$), 2.65 (д.д, 1H, $\text{C}\text{H}_2\text{N}$, $J=11.7$, $J=3.7$), 2.74 (д.д, 1H, $\text{C}\text{H}_2\text{N}$, $J=11.7$, $J=5.9$), 4.51 (д.д, 1H, CHO , $J=2.9$, $J=8.1$), 5.08 (с, 4H, $2\text{C}\text{H}_2\text{O}$), 5.24 (уш.с, 1H, OH), 6.55 (с, 1H, $\text{C}^4\text{Наром}$), 6.62 (д, 1H, C^2H и $\text{C}^6\text{Наром}$, $J=1.5$), 7.28-7.63 (м, 10H, $2\text{C}_6\text{H}_5\text{аром}$). ^1H ЯМР-спектр **29б**, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.00 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.54 (д, 1H, $\text{C}\text{H}_2\text{N}$, $J=4.6$), 4.42 (д.д, 1H, CHO), 5.06 (с, 4H, $2\text{C}\text{H}_2\text{O}$), 6.53 (1H, 30.29). Масс-спектр **29а** (ESI), m/z : 392,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 392,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Масс-спектр **29б** (ESI), m/z : 406,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 406,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (метапротеренола, **30а**)

Реакция получения 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (метапротеренола, **30а**) представлена на рисунке 3.25.

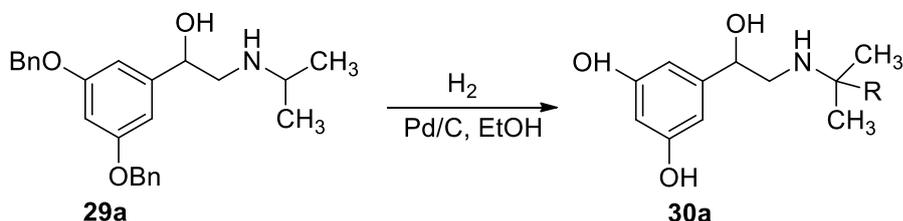


Рисунок 3.25 – Реакция получения 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (метапротеренола, **30а**)

К раствору 0,1 г (0,2 ммоль) 1-(3,5-дибензилоксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (**29а**) в 10 мл этанола добавляли 0,02 г 10 %-ного палладия на активированном угле и гидрировали в стальном автоклаве при температуре 35 °С и давлении 8 атм в течение 10 ч. Далее реакционную массу фильтровали через слой

целлита, растворитель упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 0,06 г 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола. К остатку добавляли 2 мл диэтилового эфира, упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и выдерживали в вакууме масляного насоса в течение 30 мин. Получали 0,04 г (80 %) 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(изопропиламино)этанола (метапротеренола, **30a**) в виде бежевых кристаллов с т. пл. 92-93°C, ср. лит. [42] т. пл. 100 °C. R_f 0.12 (хлороформ / метанол / 25%-ный водный аммиак, 50:10:1), коричневое пятно после проявления в иодной камере. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.08 (д, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.66 (д.д, 1H, CH_2N , $J=12.1$, $J=9.9$), 2.76 (д.д, 1H, CH_2N , $J=12.1$, $J=3.3$), 2.91 (кв, 1H, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$, $J=6.6$), 4.54 (д.д, 1H, CHO , $J=8.8$, $J=2.2$), 6.10 (с, 1H, $1\text{C}^4\text{Наром}$), 6.21 (д, 2H, C^2H и $\text{C}^6\text{Наром}$, $J^4=2.2$), 9.13 (уш.с, 2H, 2OH). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 25.9 (2CH_3), 48.6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 54.7 (CH_2), 67.4 (CHO), 101.6 (C^4), 104.3 ($\text{C}^{2,6}$), 146.6 (C^1), 158.5 ($\text{C}^{3,5}$). Масс-спектр (ESI), m/z : 212.1283 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 212.1281 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез гидрохлорида 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (тербуталина, **30б**)

Реакция получения гидрохлорида 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (тербуталина, **30б**) представлена на рисунке 3.26.

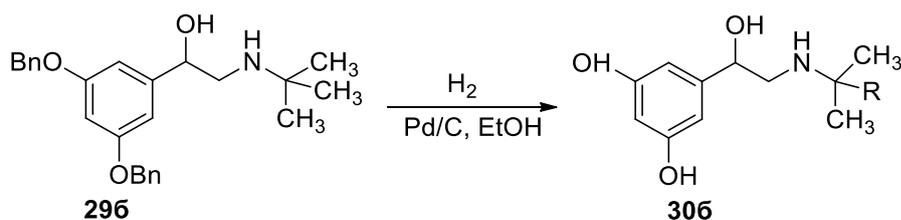


Рисунок 3.26 – Реакция получения гидрохлорида 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (тербуталина, **30б**)

К раствору 0,3 г (0,7 ммоль) 1-(3,5-добензилоксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (**296**) в 10 мл этанола добавляли 0,05 г 10 %-ного палладия на активированном угле и гидрировали в стальном автоклаве при температуре 35 °C и давлении 4 атм в течение 4 ч. Далее реакционную массу фильтровали через слой целлита, растворитель упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 0,14 г свободного 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола. Остаток

растворяли в 3 мл этанола, добавляли 0,5 мл 3,5 М раствора хлороводорода в диэтиловом эфире, перемешивали в течение 1 мин и упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Получали 0,16 г (84 %) гидрохлорида 1-(3,5-дигидроксифенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (тербуталина, **306**) в виде бежевых кристаллов с т. пл. 91-93°C, ср. лит. [182] т. пл. 215°C (R-изомер). R_f 0.35 (хлороформ / метанол / 25%-ный водный аммиак, 50:10:1), желтое пятно после проявления в иодной камере. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.32 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.83 (д.д, 1H, CH_2N , $J=10.3$, $J=8.8$), 2.93 (д.д, 1H, CH_2N , $J=11.0$, $J=8.6$), 4.79 (д, 1H, CHO , $J=9.5$), 6.19 (с, 1H, 1 $\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.29 (с, 2H, 2 $\text{CH}_{\text{аром}}$), 8.42 (уш.с, 1H, 1NH), 8.96-9.56 (уш.с, 3H, 2 $\text{OH}_{\text{аром}}$, 1NH). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 24.9 (3CH_3), 48.3 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 56.2 (CH_2), 68.8 (CHO), 101.8 (C^4), 103.8 ($\text{C}^{2,6}$), 143.9 (C^1), 158.4 ($\text{C}^{3,5}$). Масс-спектр (ESI), m/z : 226.1442 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 226.1437 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.1.8 Синтез рактопамина

Синтез гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]-амино)этилфенола (рактопамина, **33**)

Реакция получения гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]-амино)этилфенола (рактопамина, **33**) представлена на рисунке 3.27.

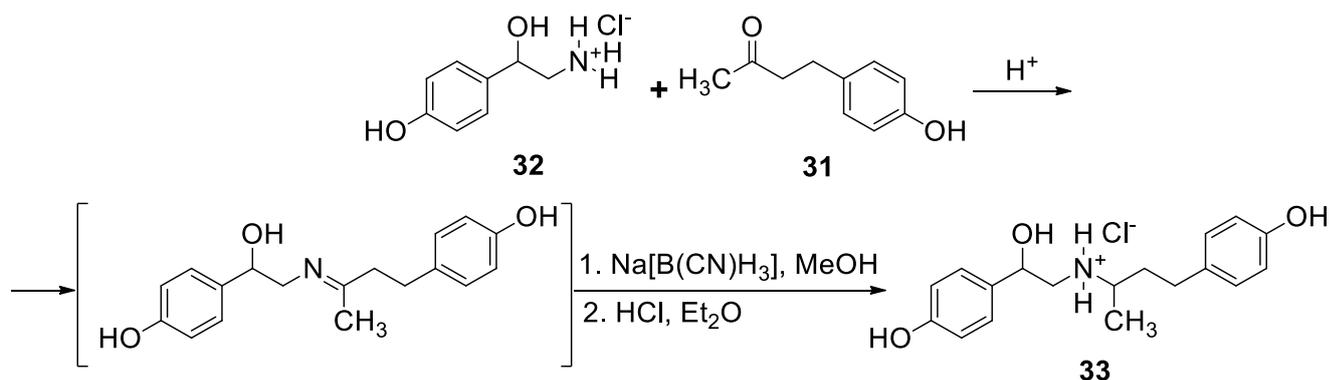


Рисунок 3.27 – Реакция получения гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]-амино)этилфенола (рактопамина, **33**)

К смеси 2,0 г (10,5 ммоль) гидрохлорида 2-амино-1-(4-гидроксифенил)этанола (октопамина, **32**) и 1,8 г (10,5 ммоль) 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она (**31**) в 40 мл метанола в атмосфере азота в течение 10 мин добавляли порциями 2,0 г (31,5 ммоль) борциангидрида натрия и перемешивали реакционную массу при комнатной температуре в течение 72 ч. К полученной смеси прибавляли по каплям 10 %-ный

водный раствор серной кислоты до прекращения выделения газа, подогрели реакцию до 40 °С и продували азотом в течение 30 мин. После охлаждения реакцию разбавляли 200 мл воды, подщелачивали, добавляя 10,0 г (120 ммоль) твердого бикарбоната натрия, и экстрагировали хлороформом (4 x 100 мл). Водную фазу отделяли, добавляли к ней 40,0 г (290 ммоль) карбоната калия и экстрагировали хлороформом (4 x 100 мл). Органические экстракты объединяли, сушили над сульфатом натрия и отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса. Остаток растворяли в 150 мл эфира и отфильтровывали от осадка. К фильтрату при перемешивании добавляли 1 мл (6 ммоль) 5,6 М раствора хлороводорода в этаноле. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получали 1,2 г (33 %) 4-(1-гидрокси-2-([3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]-амино)этилфенола (рактопамина, **33**) с т. пл. 164-165 °С, ср. лит. [52] т. пл. 104-107 °С. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.27 (т, 3H, CH₃, J=6.2), 1.59-1.81 (м, 1H, 1CH), 1.94-2.13 (м, 1H, 1CH), 2.88-3.05 (м, 2H, 2CH), 3.07-3.22 (м, 1H, 1CH), 3.29-3.50 (м, 2H, 2CH), 4.85 (т, 1H, 1CH, J=7.0), 5.93 (уш.с, 1H, CHОН), 6.68 (д, 2H, 2CHаром, J=7.7), 6.76 (д, 2H, 2CHаром, J=8.4), 7.00 (д, 2H, 2CHаром, J=8.4), 7.18 (д, 2H, 2CHаром, J=8.4), 8.53 (уш.с 1H, OH), 9.04 (с, 1H, NH), 9.21 (с, 1H, NH), 9.46 (с, 1H, OH). ¹³C ЯМР-спектр (d₆-DMSO, м.д.): 16.17 (CH₃), 30.66 (CH₂), 34.87 (CH₂), 51.18 (CH₂), 53.67 (CH), 68.78 (CHO) 115.52 (C^{3',5'}), 115.63 (C^{3,5}), 127.70 (C^{2',6'}) 127.70 (C^{2,6}), 131.22 (C^{1'}), 132.42 (C¹), 156.05 (C^{4'}), 157.57 (C⁴). Масс-спектр (ESI), m/z: 302.1754 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 302.1750 [M+H]⁺.

3.1.9 Синтез добутамина

Синтез формиата 4-(2-([3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]амино)этил)бензол-1,2-диола (добутамина, **35**)

Реакция получения формиата 4-(2-([3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]амино)этил)бензол-1,2-диола (добутамина, **35**) представлена на рисунке 3.28.

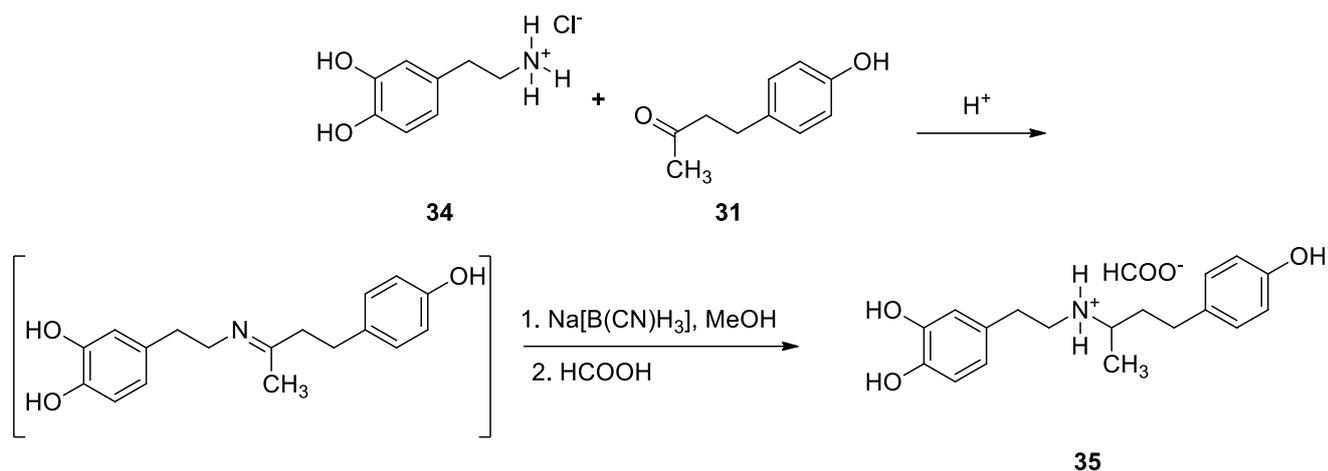


Рисунок 3.28 – Реакция получения формиата 4-(2-{[3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]амино}этил)бензол-1,2-диола (добутамина, **35**)

К 3,7 г (20 ммоль) гидрохлорида 4-(2-аминоэтил)бензол-1,2-диола (дофамина, **34**) в 50 мл метанола добавляли 0,7 г (18 ммоль) гидроксида натрия и перемешивали в течение 1 ч. Затем добавляли 3,4 г (21 ммоль) 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она (**31**) и 2,5 г (40 ммоль) борциангидрида натрия. Смесь перемешивали в течение 72 ч. Подкисляли соляной кислотой до pH=5 и упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток кипятили с 200 мл изопропанола, охлаждали и отфильтровывали. Фильтрат упаривали и делили на препаративном хроматографе. Получали 2,2 г (31 %) формиата 4-(2-{[3-(4-гидроксифенил)-1-метилпропил]амино}этил)бензол-1,2-диола (добутамина, **35**). 1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 1.22 (д, 3H, CH_3 , $J=6.4$), 1.63-1.75 (м, 2H, CH_2), 1.90-2.05 (м, 2H, CH_2), 2.53-2.60 (м, 1H, CH), 2.64-2.78 (м, 2H, CH_2), 2.91-2.98 (м, 2H, CH_2), 6.46 (д, 1H, $CH_{аром}$, $J=8.0$), 6.62-6.68 (м, 3H, $CH_{аром}$), 6.98 (д, 1H, $CH_{аром}$, $J=8.0$). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 15.99 (CH_3), 30.44 (CH_2), 31.69 (CH_2), 34.76 (CH_2), 45.75 (CH_2), 53.37 (CH), 115.65 ($C^{3',5'}$), 116.16 (C^5), 116.54 (C^2), 119.70 (C^6), 128.29 (C^1), 129.56 ($C^{2',6'}$), 131.20 ($C^{1'}$), 144.56 (C^4), 145.78 (C^3), 156.06 (C^4'). Масс-спектр (ESI), m/z: 302.1754 $[M+H]^+$. Вычислено, m/z: 302.1750 $[M+H]^+$.

3.1.10 Синтез ритодрина

Синтез N-(2-(4-бензилоксифенил)этил)-O-трет-бутилкарбамата (**37**)

Реакция получения N-(2-(4-бензилоксифенил)этил)-O-трет-бутилкарбамата (**37**) представлена на рисунке 3.29.

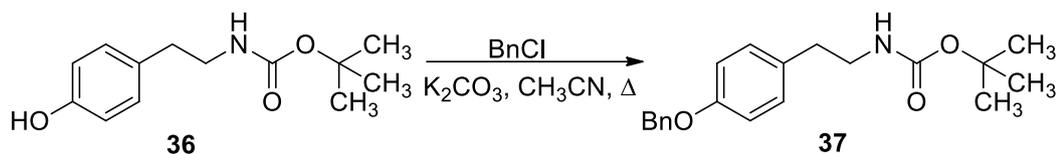


Рисунок 3.29 – Реакция получения N-(2-(4-бензилоксифенил)этил)-O-*tert*-бутилкарбамата (**37**)

К раствору 5,0 г (21 ммоль) N-(2-(4-гидроксифенил)этил)-O-*tert*-бутилкарбамата (бокированного тирамина, **36**) в 50 мл ацетонитрила добавляли 2,9 г (21 ммоль) карбоната калия и перемешивали реакционную массу при комнатной температуре в течение 30 мин, затем добавляли 2,5 мл (2,7 г, 21 ммоль) бензилхлорида и кипятили в течение 5 ч, охлаждали. Осадок отфильтровывали, маточный раствор упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 50 мл гексана, выпавший осадок отфильтровывали. Получали 6,1 г (88 %) N-(2-(4-бензилоксифенил)этил)-O-*tert*-бутилкарбамата (**37**). ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.36 (с, 9H, CH₃), 2.60-2.63 (м, 2H, CH₂), 3.07-3.12 (м, 2H, CH₂), 5.05 (с, 2H, CH₂), 6.65 (д, 1H, NH, J=8.4), 6.90 (д, 2H, CHаром, J=8.4), 7.08 (д, 2H, CHаром, J=8.4), 7.28-7.42 (м, 5H, CHаром).

Синтез трифторацетата (2-(4-(бензилокси)фенил)этил)амин (38)

Реакция получения трифторацетата (2-(4-(бензилокси)фенил)этил)амин (**38**) представлена на рисунке 3.30.

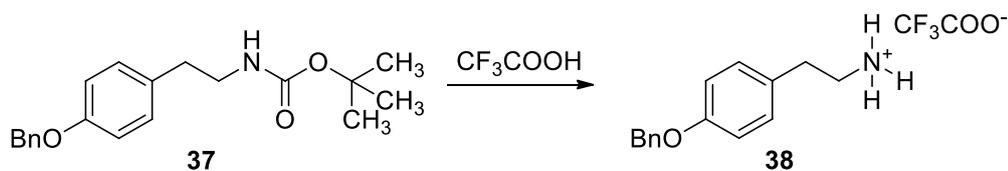


Рисунок 3.30 – Реакция получения трифторацетата (2-(4-(бензилокси)фенил)этил)амин (**38**)

Растворяли 5,0 г (15 ммоль) N-(2-(4-бензилоксифенил)этил)-O-*tert*-бутилкарбамата (**37**) в 20 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, растворитель отгоняли в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 50 мл диэтилового эфира, осадок отфильтровывали и промывали 20 мл диэтилового эфира. Получали 4,9 г (94 %) трифторацетата (2-(4-(бензилокси)фенил)этил)амин (**38**). ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 2.80 (т, 2H, CH₂, J=8.4), 3.00 (т 2H, CH₂, J=8.5), 5.07 (с, 2H, CH₂), 6.95 (д, 2H, CHаром, J=8.4),

7.15 (д, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.4$), 7.28-7.42 (м, 5H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.88 (уш.с, 2H, NH_2). Масс-спектр (ESI), m/z : 228.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 228.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 1-(4-бензилоксифенил)-2-[2-(4-бензилоксифенил)этиламино]-пропан-1-ола (**41**)

Реакция получения 1-(4-бензилоксифенил)-2-[2-(4-бензилоксифенил)этиламино]пропан-1-ола (**41**) представлена на рисунке 3.31.

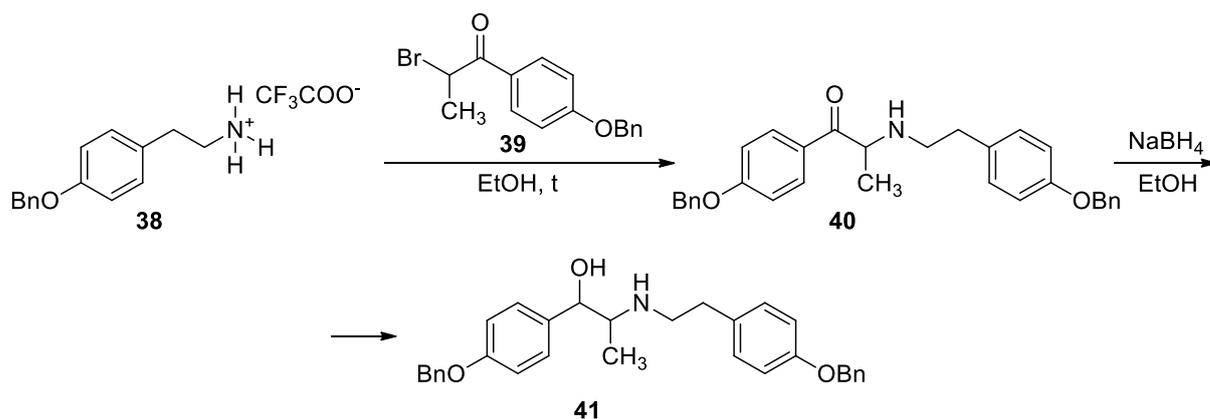


Рисунок 3.31 – Реакция получения 1-(4-бензилоксифенил)-2-[2-(4-бензилоксифенил)этиламино]пропан-1-ола (**41**)

Суспензию 0,6 г (2 ммоль) 1-(4-бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-она (**39**) в 20 мл этилового спирта охлаждали до 0 °С и прибавляли к ней 0,7 г (2 ммоль) трифторацетата (2-(4-(бензилокси)фенил)этил)амин (**38**). Снимали охлаждение и позволяли реакционной массе нагреться до комнатной температуры, а затем нагревали до 50 °С и выдерживали при этой температуре в течение 5 ч, охлаждали до комнатной температуры и добавляли порциями 0,06 г (1,5 ммоль) борогидрида натрия. Реакционную массу перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли 30 мл воды и экстрагировали метиленхлоридом (2 x 30 мл), органический слой отделяли, сушили над сульфатом магния, растворитель отгоняли в вакууме водоструйного насоса, полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии, элюен: хлороформ / метанол, 15:1. R_f 0.35. Получали 0,2 г (25 %) 1-(4-бензилоксифенил)-2-[2-(4-бензилоксифенил)этиламино]пропан-1-ола (**41**) в виде вязкого масла. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.24 (д, 3H, CH_3 , $J=6.7$), 2.57 (т, 2H, CH_2 , $J=7.4$), 2.79 (т, 2H, CH_2 , $J=7.4$), 2.94-3.01 (м, 1H, CH), 4.56 (д, 1H, CH , $J=4.2$), 5.09 (с, 2H, CH_2), 5.11 (с, 2H, CH_2),

6.95 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.4$), 7.00 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.4$), 7.11 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=9.2$), 7.25 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.5$), 7.32-7.47 (м, 10H, $S_{\text{Наром}}$). Масс-спектр (ESI), m/z : 468.6 $[M+H]^+$. Вычислено, m/z : 468.5 $[M+H]^+$.

Синтез гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([2-(4-гидроксифенил)-этиламино]пропил)фенола (ритодрина, 42)

Реакция получения гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([2-(4-гидроксифенил)-этиламино]пропил)фенола (ритодрина, 42) представлена на рисунке 3.32.

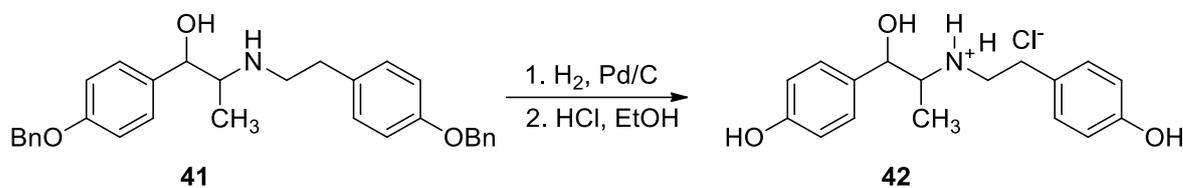


Рисунок 3.32 – Реакция получения гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([2-(4-гидроксифенил)-этиламино]пропил)фенола (ритодрина, 42)

К суспензии 0,03 г 5 %-ного палладия на угле в 5 мл воды и 5 мл этанола добавляли 0,5 г (1 ммоль) 1-(4-бензилоксифенил)-2-[2-(4-бензилоксифенил)этиламино]пропан-1-ола (41), затем добавляли 1 мл 2 Н раствора соляной кислоты и полученную смесь гидрировали при комнатной температуре и давлении 1.1 атм в течение ночи. Затем осадок отфильтровывали через слой целлита, промывали этанолом (2 x 25 мл), маточный раствор упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток разделяли методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ / метанол, 10:1, $R_f=0.2$. После упаривания растворителя в вакууме водоструйного насоса, остаток растворяли в 3 мл метанола, прибавляли 1 мл 30 %-ного раствора хлороводорода в изопропанол, растворитель упаривали и получали 0,3 г (82 %) гидрохлорида 4-(1-гидрокси-2-([2-(4-гидроксифенил)-этиламино]пропил)фенола (ритодрина, 42) с т. пл. 189-192°C. ^1H ЯМР-спектр, (D_2O , м.д., $J/\text{Гц}$): .08 (д, 3H, CH_3 , $J=6.8$), 2.86 (т, 2H, CH_2 , $J=7.5$), 3.18-3.30 (м, 2H, CH_2), 3.40-3.44 (м, 1H, CH), 3.45 - 3.40 (м, 1H), 4.88 (д, 1H, CH , $J=4.2$), 6.79 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.45$), 6.82 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.45$), 7.0 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.5$), 7.13 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.5$). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): . 1.24 (д, 3H, CH_3 , $J=6.7$), 2.58 (т, 2H, CH_2 , $J=7.4$), 2.82 (т, 2H, CH_2 , $J=7.4$), 2.94-3.00 (м, 1H, CH), 4.56 (д, 1H, CH , $J=4.0$), 6.60 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.6$), 6.70 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.9$), 7.03 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.9$), 7.25 (д, 2H, $S_{\text{Наром}}$, $J=8.6$). ^{13}C ЯМР-

спектр (D_2O , м.д.): 10.25 (CH_3), 30.68 (CH_2), 46.28 (CH_2), 58.55 (CH), 71.37 (CH), 115.57 ($C_{Наром}$), 115.83 ($C_{Наром}$), 127.65 ($C_{Наром}$), 128.03 ($C_{аром}$), 130.11 ($C_{Наром}$), 130.19 ($C_{аром}$), 154.62 ($C_{аром-OH}$), 155.58 ($C_{аром-OH}$). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 9.84 (CH_3), 31.40 (CH_2), 46.59 (CH_2), 58.99 (CH), 69.72 (CH), 115.37 ($C_{Наром}$), 115.87 ($C_{Наром}$), 127.35 ($C_{Наром}$), 127.87 ($C_{аром}$), 129.99 ($C_{Наром}$), 131.68 ($C_{аром}$), 156.66 ($C_{аром-OH}$), 157.05 ($C_{аром-OH}$). Масс-спектр (ESI), m/z : 288.1598 $[M+H]^+$. Вычислено, m/z : 288.1594 $[M+H]^+$.

3.1.1.11 Синтез прокатерола

Синтез 8-гидроксихинолин-1-оксида (44)

Реакция получения 8-гидроксихинолин-1-оксида (44) представлена на рисунке 3.33.

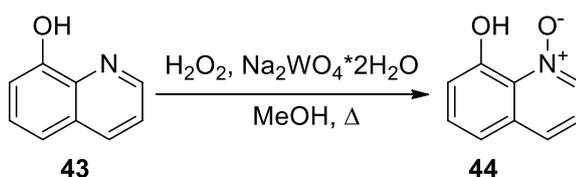


Рисунок 3.33 – Реакция получения 8-гидроксихинолин-1-оксида (44)

К смеси 10,0 г (71 ммоль) 8-гидроксихинолина (43) и 0,1 г (0,3 ммоль) вольфрамата натрия дигидрата в 40 мл метанола при 60 °С добавляли вначале 1,6 мл, а затем еще 9 мл (104 ммоль) 30 %-ного водного раствора пероксида водорода. После кипячения в течение 9 ч реакционную массу охлаждали и затем захлаживали до 0 С. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Получали 9,1 г (63 %) 8-гидроксихинолин-1-оксида (44) с т. пл. 136-138°С, ср. лит. [84] т. пл. 137-139 °С. 1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Γ ц): 6.96 (д, 1H, C^3 Наром, $J=7.9$), 7.39 (д, 1H, C^5 Наром, $J=8.2$), 7.44 (м, 1H, C^5 Наром), 7.51 (т, 1H, C^7 Наром, $J=7.9$), 8.04 (д, 1H, C^4 Наром, $J=8.5$), 8.47 (д, 1H, C^2 Наром, $J=6.6$), 15.44 (уш.с, 1H, OH). Масс-спектр (ESI), m/z : 162.1 $[M+H]^+$. Вычислено, m/z : 162.1 $[M+H]^+$.

Синтез 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-илацетата (45)

Реакция получения 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-илацетата (45) представлена на рисунке 3.34.

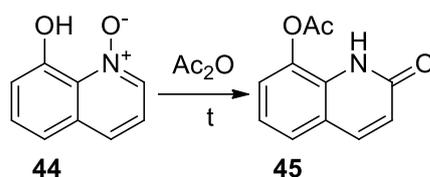


Рисунок 3.34 – Реакция получения 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-илацетата (**45**)

К 8,1 г (50 ммоль) 8-гидроксихинолин-1-оксида (**44**) добавляли 80 мл (0,8 моль) уксусного ангидрида и реакцию выдерживали при температуре 100 °С в течение 8 ч в атмосфере аргона. Затем реакцию выливали на лед и подщелачивали до нейтральной реакции среды водным раствором аммиака. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Получали 9,0 г (88 %) 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-илацетата (**45**) с т. пл. 230-235°С, ср. лит. [84] т. пл. 231-136 °С. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 2.35 (с, 3Н, CH₃), 6.52 (д, 1Н, С⁷Наром, J=9.5), 7.16 (м, 1Н, С⁶Наром), 7.27 (д, 1Н, С⁷Наром), 7.55 (м, 1Н, С⁵Наром), 7.94 (д, 1Н, С⁴Наром, J=9.8), 11.62 (уш.с, 1Н, ОН-НН). Масс-спектр (ESI), m/z: 204.1 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 204.1 [M+H]⁺.

Синтез 8-гидроксихинолин-2-она (**46**)

Реакция получения 8-гидроксихинолин-2-она (**46**) представлена на рисунке 3.35.

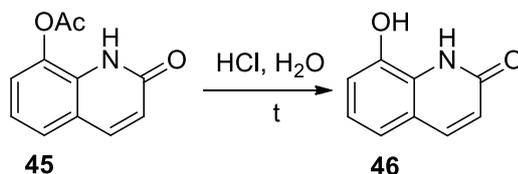


Рисунок 3.35 – Реакция получения 8-гидроксихинолин-2-она (**46**)

К 8,8 г (43,5 ммоль) 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-8-илацетата (**45**) добавляли смесь 15 мл 35 %-ной соляной кислоты с 30 мл воды и перемешивали в течение 2 ч при температуре 95 °С. Затем реакцию охлаждали до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Получали 6,5 г (93 %) 8-гидроксихинолин-2-она (**46**) с т. пл. 248-250°С, ср. лит. [84] т. пл. 249-250°С. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 6.50 (д, 1Н, С⁷Наром, J=9.9), 6.97 (м, 2Н, С⁶Наром, С⁷Наром), 7.09 (м, 1Н, С⁵Наром), 7.82 (д, 1Н, С⁴Наром, J=9.9), 10.23 (уш.с, 1Н, NH), 10.49 (уш.с, 1Н, ОН). Масс-спектр (ESI), m/z: 162.1 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 162.1 [M+H]⁺.

Синтез 2-бром-1-(8-гидроксихинолин-5-ил)бутан-1-она (47)

Реакция получения 2-бром-1-(8-гидроксихинолин-5-ил)бутан-1-она (47) представлена на рисунке 3.36.

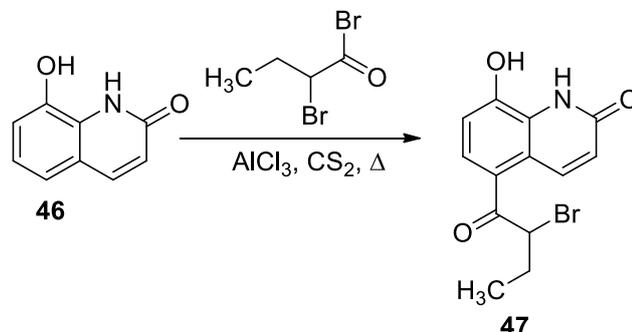


Рисунок 3.36 – Реакция получения 2-бром-1-(8-гидроксихинолин-5-ил)бутан-1-она (47)

К смеси 1,7 г (10 ммоль) 8-гидроксихинолин-2-она (46) и 6,0 г (21 ммоль) 2-бромбутироилбромида в 80 мл сухого сероуглерода порционно добавляли 4,6 г (31 ммоль) хлористого алюминия, реакционную массу кипятили в течение 6 ч. Далее выпавший осадок отфильтровывали и тщательно промывали его водой и метанолом, высушивали на воздухе. Получали 2,4 г (75 %) технического 2-бром-1-(8-гидроксихинолин-5-ил)бутан-1-она (47) с т. пл. 140-143 °С. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.01 (м, 3H, CH₃), 1.97-2.02 (м, 2H, CH₂CH₃), 5.61 (т, 1H, CHBr), 6.64 (м, 1H, Шаром), 7.01 (м, 1H, Шаром), 7.83 (м, 1H, Шаром), 8.49 (м, 1H, Шаром), 10.78 (уш.с, 1H, OH), 11.56 (уш.с, 1H, NH).

Синтез 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-она (48)

Реакция получения 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-она (48) представлена на рисунке 3.37.

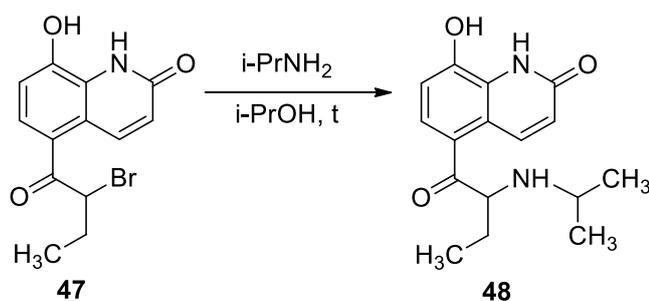


Рисунок 3.37 – Реакция получения 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-она (48)

К суспензии 2,5 г (8 ммоль) 2-бром-1-(8-гидроксихинолин-5-ил)бутан-1-она (**47**) в 50 мл изопропанола добавляли 4,8 мл (81 ммоль) изопропиламина. Реакционную массу перемешивали при 30 °С в течение 6 ч. Затем избыток амина и растворителя удаляли на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток захолаживали, осадок промывали 20 мл холодного изопропилового спирта и высушивали на воздухе. Получали 1,1 г (90 %) 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-она (**48**) с т. пл. 248-250 °С, ср. лит. [77] т. пл. 245-247 °С. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 0.93 (т, 3Н, CH₃, J=7.11), 1.00 (д, 6Н, 2 CH₃, J=6.74), 1.71-1.88 (м, 2Н, CH₂), 2.69 (м, 1Н, CH(CH₃)₂), 3.88 (м, 1Н, CHN), 6.29 (с, 1Н, СНаром), 6.94 (уш.с, 1Н, NH), 6.97-7.26 (м, 3Н, 3СНаром), 9.74 (с, 1Н, OH), 11.91 (уш.с, 1Н, NHаром). Масс-спектр (ESI), m/z: 289.3 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 289.1 [M+H]⁺.

Синтез гидрохлорида 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-ола (прокатерола, **49**)

Реакция получения гидрохлорида 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-ола (прокатерола, **49**) представлена на рисунке 3.38.

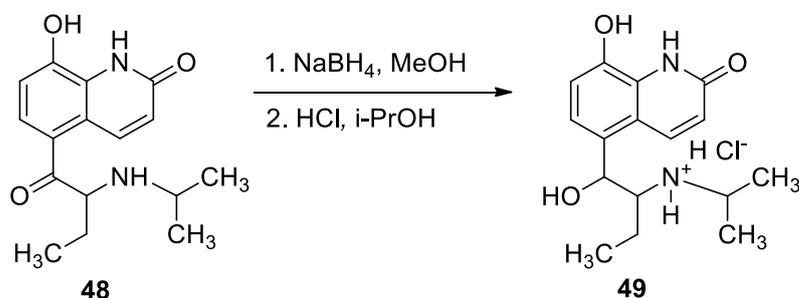


Рисунок 3.38 – Реакция получения гидрохлорида 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-ола (прокатерола, **49**)

К раствору 1,5 г (5 ммоль) 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-она (**48**) в 30 мл метанола, охлажденному до 10 °С, порционно добавляли 0,3 г (8 ммоль) борогидрида натрия, перемешивали в течение 30 мин. Затем реакционную массу подкисляли до рН=1 концентрированной соляной кислотой. Полученный осадок отфильтровывали. Жидкую фазу упаривали, к остатку добавляли 30 мл метанола и удаляли остатки борной кислоты в виде метилбората отгонкой в вакууме водоструйного насоса. Остаток промывали ацетоном, растворяли в 10 мл воды и подщелачивали. К полученному свободному основанию добавляли 5 мл изопропанола и подкисляли до

pH=1 раствором соляной кислоты, осадок отфильтровывали, высушивали в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали 1,1 г (70 %) гидрохлорида 1-(8-гидроксихинолин-5-ил)-2-(изопропиламино)бутан-1-ола (прокатерола, **49**), гигроскопичные кристаллы с т. пл. 213-214°C, ср. лит. [77] 213-216°C. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): . 1.23 (м, 9H, 3CH₃), 2.19-2.37 (м, 2H, CH₂), 3.26 (м, 1H, СНОH), 5.05 (м, 2H, 2CH), 5.85 (с, 1H, СНОH), 6.78 (м, 1H, СHаром), 7.51-7.64 (м, 2H, 2СHаром), 8.50 (м, 1H, СHаром), 11.81 (уш.с, 1H, OH), 12.06 (уш.с, 1H, NH). ¹³C ЯМР-спектр (d₆-DMSO, м.д.): 12.02 (СН₃-СН₂), 21.91 (СН₂-СН₃), 23.15 (2СН₃), 48.11 (СН(СН₃)₂), 62.01 (СН-СН₂), 71.10 (СНОH), 115.43 (СHаром), 120.70 (Саром), 121.94 (СHаром), 124.00 (СHаром), 128.51 (Саром), 130.11 (Саром), 139.18 (СHаром), 143.19 (Саром-OH), 162.00 (Саром-O). Масс-спектр (ESI), m/z: 291.1704 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 291.1703 [M+H]⁺.

3.1.1.12 Синтез изоксуприна

Синтез хлорацетона (**50**)

Реакция получения хлорацетона (**50**) представлена на рисунке 3.39.

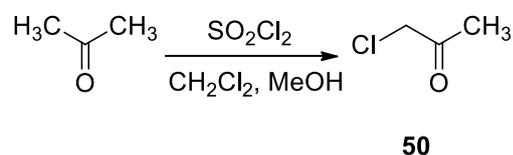


Рисунок 3.39 – Реакция получения хлорацетона (**50**)

К раствору 14,7 мл (11,6 г, 200 ммоль) ацетона, 24,3 мл (19,2 г, 600 ммоль) метанола в 100 мл метиленхлорида прибавляли по каплям 17,8 мл (29,6 г, 220 ммоль) сульфурилхлорида в течение 30 мин и перемешивали в течение 4 ч. Реакционную массу прибавляли к 200 мл насыщенного раствора гидрокарбоната натрия, нейтрализовали, добавляя 12,0 г (148 ммоль) гидрокарбоната натрия до значения pH=7 водного слоя, органический слой отделяли, промывали 20 мл насыщенного раствора гидрокарбоната натрия, 20 мл рассола и высушивали над сульфатом магния. Отгоняли растворители на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток перегоняли с дефлегматором при атмосферном давлении. Получали 7,1 г (39 %) хлорацетона (**50**) с т.кип. 115-121°C, n_D³⁰ 1.4261; ср. лит. [183] т.кип. 118-120 °C (763 Торр), с n_D²⁰ 1.433. ¹H ЯМР-спектр, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 2.92 (с, 3H, CH₃), 4.08 (с, 2H, CH₂).

Синтез феноксиацетона (**51**)

Реакция получения феноксиацетона (**51**) представлена на рисунке 3.40.

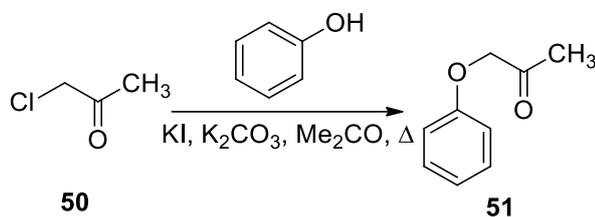


Рисунок 3.40 – Реакция получения феноксиацетона (**51**)

К раствору 6,0 г (68 ммоль) фенола в 100 мл сухого ацетона добавляли 9,8 г (70 ммоль) безводного свежерастертого порошка карбоната калия, 1,1 г (7 ммоль) йодида калия и перемешивали в течение 30 мин. Затем к суспензии добавляли по каплям 7,0 г (70 ммоль) хлорацетона (**50**) в течение 30 мин и кипятили в течение 3 ч. После охлаждения реакционной массы осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (3 x 10 мл). Из фильтрата отгоняли растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к органическому остатку в виде светло-желтого масла добавляли 70 мл этилацетата и 10 мл воды, слои разделяли. Органический слой промывали расслолом (2 x 10 мл). Объединенные водные слои экстрагировали 10 мл этилацетата, органический слой промывали расслолом (2 x 5 мл). Объединенные органические слои высушивали над сульфатом магния, отгоняли растворитель в вакууме водоструйного насоса. Остаток перегоняли в вакууме водоструйного насоса. Получали 7,7 г (75 %) феноксиацетона (**51**) с т.кип. 126-130 °С (21 Торр), n_D^{24} 1.5186; ср. лит. [184] т.кип. 117-120 °С (19 Торр), [185] n_D^{20} 1.5228. R_f 0.69 (хлороформ / метанол, 10:1), желтое пятно после опрыскивания раствором ДНФГ. ¹H ЯМР-спектр, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 2.31 (с, 3H, CH₃), 4.56 (м, 2H, CH₂), 6.92 (д, 2H, C²H и C⁶Hаром, $J^3 = 7.4$), 7.02 (т, 1H, C⁴Hаром, $J^3 = 7.4$), 7.33 (т, 2H, C³H и C⁵Hаром, $J^3 = 7.4$). Масс-спектр (ESI), m/z: 150.1 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 150.1 [M+H]⁺.

Синтез оксима феноксиацетона (**52**)

Реакция получения оксима феноксиацетона (**52**) представлена на рисунке 3.41.

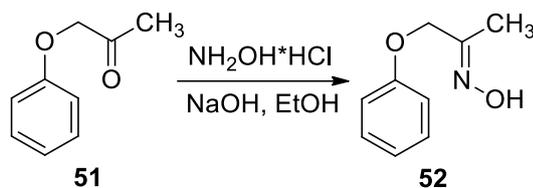


Рисунок 3.41 – Реакция получения оксима феноксиацетона (**52**)

К раствору 6,0 г (40 ммоль) феноксиацетона (**51**) и 4,1 г (60 ммоль) гидрохлорида гидроксилamina в 70 мл абсолютного этанола добавляли раствор 2,5 г (60 ммоль) гидроксида натрия в 30 мл абсолютного этанола, и перемешивали в течение 3 ч. Затем из реакционной массы отгоняли растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к остатку прибавляли 40 мл воды и экстрагировали этилацетатом (3 x 40 мл), объединенную органическую фазу промывали 20 мл рассола и высушивали над сульфатом магния. Отгоняли растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 5,9 г (89 %) оксима феноксиацетона (**52**) в виде светло-желтого масла, смесь изомеров в соотношении 76:24. R_f 0.60 (хлороформ / метанол, 10:1), желтое пятно после опрыскивания раствором ДНФГ. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 1.99 (с, 3H, CH_3 , изомер В), 2.02 (с, 3H, CH_3 , изомер А), 4.57 (с, 2H, CH_2 , изомер А), 4.94 (с, 2H, CH_2 , изомер В), 6.89-7.03 (м, 3H, 3СНаром.), 7.20-7.35 (м, 2H, 2СНаром.), 7.68 (уш.с, 1H, OH). Масс-спектр (ESI), m/z : 166.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 166.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 1-фенокси-2-пропанамина (**53**)

Реакция получения 1-фенокси-2-пропанамина (**53**) представлена на рисунке 3.42.

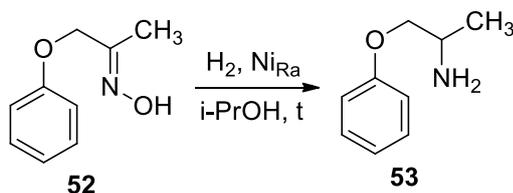


Рисунок 3.42 – Реакция получения 1-фенокси-2-пропанамина (**53**)

К раствору 5,9 г (36 ммоль) оксима феноксиацетона (**52**) в 120 мл изопропанола добавляли 0,6 г никеля Ренея и гидрировали в стальном автоклаве емкостью 500 мл при температуре 35 °С и давлении 5 атм в течение 18 ч. Далее реакционную массу фильтровали через слой целлита, растворитель упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 5,4 г (98 %) 1-фенокси-2-пропанамина (**53**) в виде светло-желтой жидкости. R_f 0.38 (хлороформ / метанол, 10:1), оранжевое пятно после

опрыскивания реактивом Драгендорфа. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.18 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 6.6$), 1.76 (уш.с, 2H, NH_2), 3.29-3.39 (м, 1H, CHNH_2), 3.70 (д.д, 1H, OCH_2 , $J^2 = 8.7$, $J^3 = 7.5$), 3.86 (д.д, 1H, OCH_2 , $J^2 = 9.1$, $J^3 = 4.2$), 6.90 (д, 2H, C^2H и C^6H аром, $J^3 = 7.9$), 6.94 (д, 1H, C^4H аром, $J^3 = 7.5$), 7.23-7.31 (м, 2H, C^3H и C^3H аром). Масс-спектр (ESI), m/z : 152.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 152.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55)

Реакция получения 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55) представлена на рисунке 3.43.

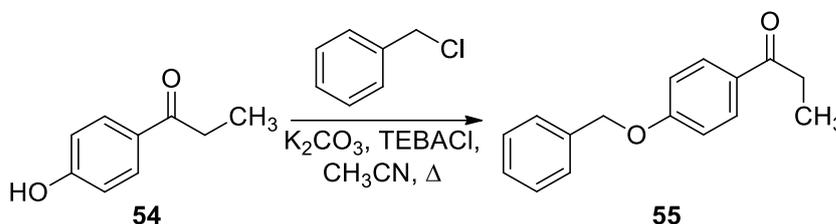


Рисунок 3.43 – Реакция получения 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55)

К перемешиваемой смеси 15,1 г (110 ммоль) 1-(4-гидроксифенил)пропан-1-она (54), 59,8 г (433 ммоль) карбоната калия, 2,5 г (11 ммоль) бензилтриэтиламмоний хлорида в 250 мл сухого ацетонитрила, прибавляли по каплям 19,0 мл (21,0 г, 165 ммоль) бензилхлорида, нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 20 ч. Реакционную массу фильтровали, фильтрат упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. К остатку добавляли 150 мл гексана, выпавший белый осадок отфильтровывали. Получали 18,0 г (69 %) 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55) в виде белых кристаллов с т.пл. 101-102°С, ср. лит. [186] т. пл. 101-102°С. $R_f=0.93$ (хлороформ / метанол, 10:1).

Из фильтрата дополнительно выпало 4,3 г 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55). Суммарный выход 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55) составил 86 %. ^1H ЯМР-спектр, ($d_6\text{-DMSO}$, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.06 (т, 3H, $J=7.2$ Гц), 2.91.-2.96 (д.д, 2H, $J=7.2$ Гц), 5.18 (с, 2H), 7.08 (д, 2H, $J=8.8$ Гц), 7.29-7.50 (м, 5H), 7.90 (д, 2H, $J=8.8$ Гц). Масс-спектр (ESI), m/z : 241.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 241.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 1-(4-бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-она (56)

Реакция получения 1-(4-(бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-она (56) представлена на рисунке 3.44.

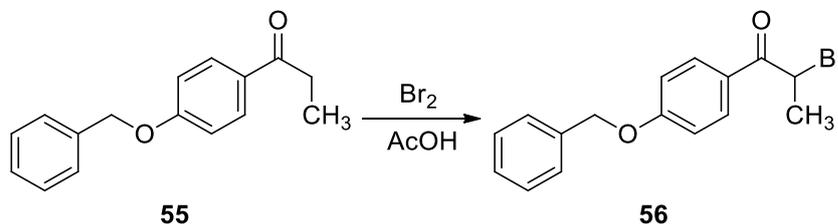


Рисунок 3.44 – Реакция получения 1-(4-(бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-она (56)

К суспензии 7,8 г (32 ммоль) 1-(4-бензилоксифенил)пропан-1-она (55) в 40 мл уксусной кислоты, охлажденной до 0 °С в бане с ледяной водой, прибавляли по каплям 1,6 мл (5,1 г, 32 ммоль) брома. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре до получения прозрачного желтого раствора. Затем реакцию массу охлаждали до 0 °С, добавляли 150 мл воды и экстрагировали диэтиловым эфиром (3 x 150 мл), органический слой высушивали над сульфатом магния, упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток разделяли методом колоночной хроматографии, элюент: гексан / этилацетат, 100:1. Получали 7,3 г (71 %) 1-(4-(бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-она (56) с т.пл. 75-76 °С, ср. лит. [186] т.пл. 74-75 °С. $R_f = 0.21$ (гексан / этилацетат, 3:1). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.75 (д, 3H, $J=6.4$ Гц), 5.21 (с, 2H), 7.13 (д, 2H, $J=6.8$ Гц), 7.30-7.48 (м, 5H), 7.99 (д, 2H, $J=6.8$ Гц). Масс-спектр (ESI), m/z : 319.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 319.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 1-(4-бензилоксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-она (57)

Реакция получения 1-(4-бензилоксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-она (57) представлена на рисунке 3.45.

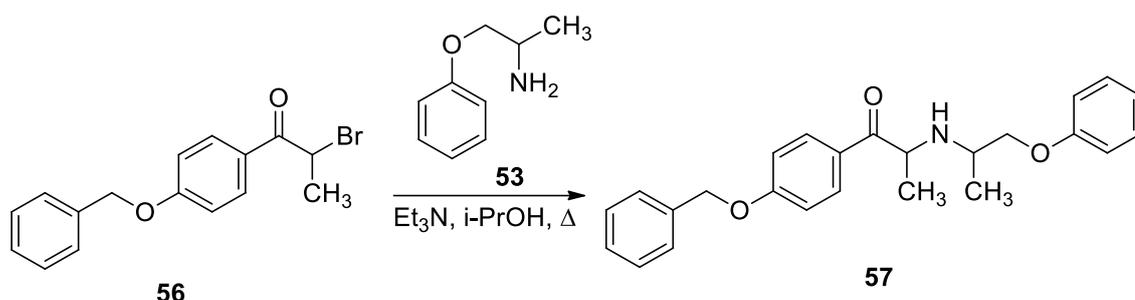


Рисунок 3.45 – Реакция получения 1-(4-бензилоксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-она (**57**)

К смеси 0,4 г (2,6 ммоль) 1-фенокси-2-пропанамина (**53**) и 0,3 г (2,8 ммоль) триэтиламина в 4 мл изопропанола, нагретой до 50 °С присыпали порциями (x 10) в течение 10 мин 0,8 г (2,5 ммоль) 1-(4-(бензилоксифенил)-2-бромпропан-1-она (**56**), довели до кипения и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Затем из реакционной массы отгоняли растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к органическому остатку в виде желтого масла добавляли 6 мл этилацетата, промывали водой (3 x 2 мл), 2 мл рассола. Водные слои объединяли, экстрагировали 4 мл этилацетата, промывали водой (3 x 1 мл), 1 мл рассола. Органические слои объединяли, высушивали над сульфатом магния, отгоняли растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса, получали 1,0 г технического 1-(4-бензилоксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-она (**57**) в виде желтого масла. Затем технический продукт очищали методом колоночной хроматографии на силкагеле, элюент: хлороформ / метанол, 20:1. Получали 0,4 г (47 %) в виде желтого масла. R_f 0.60 (хлороформ / метанол, 20:1), оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.05 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 6.4$, изомер В), 1.06 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 6.4$, изомер А), 1.15 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 6.8$, изомер А), 1.16 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 6.8$, изомер В), 2.92 (кв, 1H, $\underline{\text{CH}}\text{CH}_2\text{O}$, $J^3 = 6.4$, изомер А), 2.98 (кв, 1H, $\underline{\text{CH}}\text{CH}_2\text{O}$, $J^3 = 6.0$, изомер В), 3.75 (д.д, 2H, OCH_2 , $J^2 = 12.4$, $J^3 = 6.0$, изомер А), 3.90 (д.д, 2H, OCH_2 , $J^2 = 9.6$, $J^3 = 6.0$, изомер В), 4.50 (кв, 1H, $\underline{\text{CH}}(\text{C}=\text{O})$, $J^3 = 6.8$, изомер В), 4.57 (кв, 1H, $\underline{\text{CH}}(\text{C}=\text{O})$, $J^3 = 7.2$, изомер А), 5.19 (с, 2H, PhCH_2O , изомер В), 5.20 (с, 2H, PhCH_2O , изомер А), 6.71 - 7.42 (м, 12H, 12CH аром.), 7.43 (уш.с, 1H, $\underline{\text{NH}}$, изомер А), 7.45 (уш.с, 1H, $\underline{\text{NH}}$, изомер В), 7.98 (д, 2H, C^2H и C^6H аром., $J^3 = 8.8$). Масс-спектр (ESI), m/z : 390.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 390.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез гидрохлорида 1-(4-гидроксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-ола (изокусуприна, **58**)

Реакция получения гидрохлорида 1-(4-гидроксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-ола (изокусуприна, **58**) представлена на рисунке 3.46.

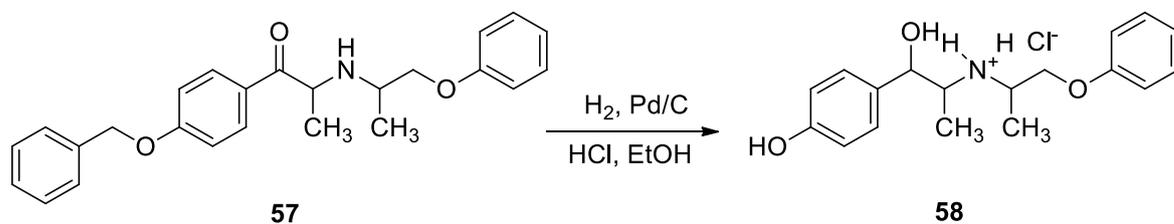


Рисунок 3.46 – Реакция получения гидрохлорида 1-(4-гидроксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-ола (изокусуприна, **58**)

К раствору 0,2 г (0,6 ммоль) 1-(4-бензилоксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-ола (**57**) в 10 мл этанола добавляли 0,06 мл (0,7 ммоль) концентрированной соляной кислоты и 0,05 г 10 %-ного палладия на активированном угле и гидрировали в стальном автоклаве при комнатной температуре и давлении 2 атм в течение 24 ч. Далее реакционную массу фильтровали через слой целлита, растворитель упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 0,2 г технического 1-(4-гидроксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-ола в виде светло-коричневого масла. К остатку добавляли 2 мл диэтилового эфира и 1 мл абсолютного этанола, выдерживали в холодильнике, осадок отфильтровывали. Получали 0,033 г (20 %) гидрохлорида 1-(4-гидроксифенил)-2-(1-метил-2-феноксиэтиламино)пропан-1-ола (изокусуприна, **58**) в виде светло бежевых кристаллов с т. пл. 216-218°C; ср. лит. [99] для рацемата т.пл. 202-203°C. R_f 0.28 (хлороформ / метанол / 25 %-ный водный аммиак, 50:10:1), оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.00 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 5.8$), 1.43 (д, 3H, CH_3 , $J^3 = 4.4$), 2.92 (кв, 1H, CHCH_2O , $J^3 = 6.4$, изомер А), 2.98 (кв, 1H, CHCH_2O , $J^3 = 6.0$, изомер В), 3.48 (уш.с, 1H, CH), 3.80 (уш.с, 1H, CH), 4.29 (д.м, 2H, OCH_2 , $J^2 = 13.2$), 5.15 (уш.с, 1H, CH), 5.99 (уш.с, 1H, CHOH), 6.78 (д, 2H, 2CHаром, $J^3 = 7.3$), 7.02 (д, (3H, 3CHаром, $J^3 = 6.6$), 7.18 (д, 2H, 2CHаром, $J^3 = 7.3$), 7.35 (т, 2H, 2CH аром, $J^3 = 6.6$), 8.92 (уш.с, 2H, NH_2), 9.44 (уш.с, 1H, OH). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 10.36 (CH_3), 14.71 (CH_3), 50.56 (CH-CH_3), 50.78 (CH-CH_3), 68.62 (CH_2), 69.04 (CHOH), 115.13 (CHаром), 115.17 (CHаром), 115.40 (CHаром), 121.75 (CHаром), 127.35 (CHаром), 127.42 (CHаром), 130.08 (CHаром),

130.12 (СНаром), 131.61 (Саром), 157.08 (Саром-ОН), 158.23 (Саром-О). Масс-спектр (ESI), m/z : 302.1754 $[M+H]^+$. Вычислено, m/z : 320.1750 $[M+H]^+$.

3.1.1.13 Синтез хигенамина

Синтез N-[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-2-(4-метоксифенил)ацетамида (**61**)

Реакция получения N-[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-2-(4-метоксифенил)ацетамида (**61**) представлена на рисунке 3.47.

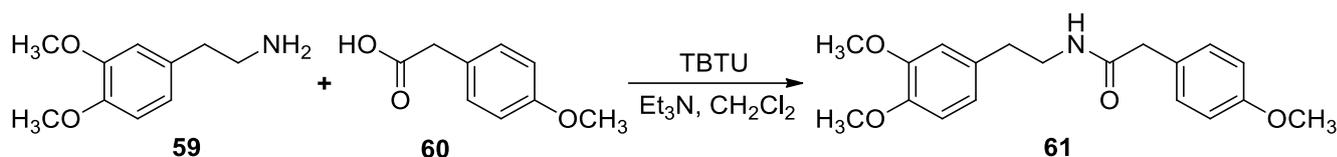


Рисунок 3.47 – Реакция получения N-[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-2-(4-метоксифенил)ацетамида (**61**)

К раствору 0,9 г (5,5 ммоль) 4-метоксифенилуксусной кислоты (**60**) в 40 мл хлористого метилена добавляли 1,5 мл (1,2 г, 11 ммоль) триэтиламина и 1,8 г (5,5 ммоль) *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуроний тетрафторбората, перемешивали в течение 15 мин, после чего по каплям добавляли раствор 2-(3,4-диметоксифенил)этиламина (**59**) в 10 мл хлористого метилена. Реакционную массу выдерживали при комнатной температуре в течение 48 ч, затем выливают в 30 %-ный водный раствор карбоната калия, отделяли органическую фазу и высушивали ее над сульфатом магния. Растворитель удаляли на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток делили методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ / метанол, 100:1. Получали 1,7 г (89 %) N-[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-2-(4-метоксифенил)ацетамида (**61**) в виде светло-желтых кристаллов с т. пл. 118-120⁰С. R_f 0.30 (хлороформ / метанол, 100:1), оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. ¹H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.69 (м, 2H, CH_2), 3.19 (с, 2H, CH_2CO), 3.52 (м, 2H, 12 CH_2N), 3.69 (с, 6H, 2 CH_3), 3.77 (с, 3H, CH_3), 6.77 (д.д, 1H, СНаром, $J=8.72$, $J=1.24$), 6.83-6.87 (м, 3H, СНаром), 6.99 (д, 1H, Снаром, $J=1.24$), 7.09-7.11 (м, 2H, 2Снаром), 7.75 (м, 1H, NH). Масс-спектр (ESI), m/z : 329.4 $[M+H]^+$. Вычислено, m/z : 329.5 $[M+H]^+$.

Синтез 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-3,4-дигидроизохинолина (62)

Реакция получения 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-3,4-дигидроизохинолина (62) представлена на рисунке 3.48.

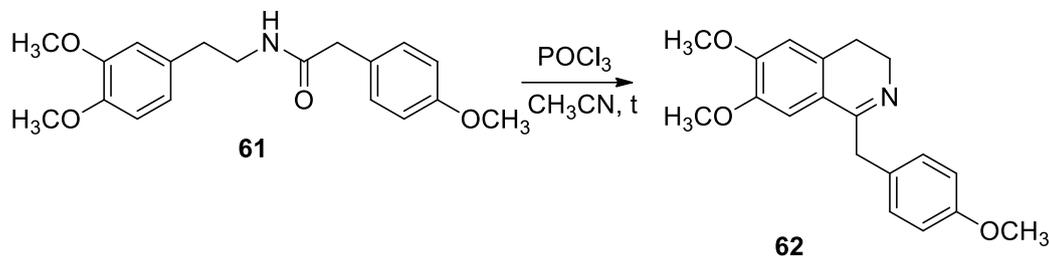


Рисунок 3.48 – Реакция получения 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-3,4-дигидроизохинолина (62)

К раствору 1,5 г (4,6 ммоль) N-[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-2-(4-метоксифенил)ацетамида (61) в 20 мл сухого ацетонитрила по каплям добавляли 2,1 мл хлорокси фосфора и кипятили полученный раствор в течение 2 ч. Далее реакционную массу упаривали досуха на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток растворяли в 150 мл хлороформа и промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (4 x 25 мл). Органическую фазу высушивали над сульфатом магния. Растворитель отгоняли на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Получали 1,4 г (97 %) 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-3,4-дигидроизохинолина (62) в виде темно-оранжевого масла. R_f 0.10 (хлороформ / метанол, 100:1), красно-оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. Технический продукт без дальнейшей очистки вводили в следующую реакцию.

Синтез 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (63)

Реакция получения 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (63) представлена на рисунке 3.49.

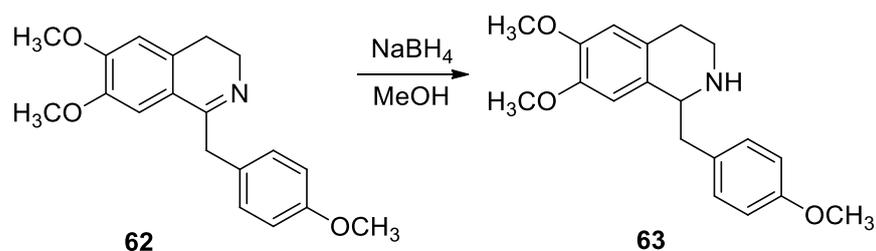


Рисунок 3.49 – Реакция получения 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (**63**)

К охлажденному на ледяной бане раствору 1,3 г (4,2 ммоль) 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-3,4-дигидроизохинолина (**62**) в 40 мл метилового спирта порциями добавляли 0,1 г (3,1 ммоль) борогидрида натрия и перемешивали в течение ночи. Реакционную массу упаривали досуха, остаток растворяли в 100 мл хлороформа и промывали водой (2 x 50 мл), насыщенным раствором хлористого натрия. Растворитель отгоняли на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток делили методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ / метанол, 5:1. Получали 1,2 г (96 %) 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (**63**). R_f 0.50 (хлороформ / метанол, 5:1), красно-оранжевое пятно после опрыскивания реактивом Драгендорфа. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.59-2.66 (м, 2H, CH_2), 3.60-3.64 (м, 2H, CH_2), 3.77 (с, 3H, CH_3), 3.84 (с, 6H, 2CH_3), 4.09 (с, 2H, CH_2), 6.69-6.71 (м, $2\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.99 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.09-7.16 (м, 3H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Масс-спектр (ESI), m/z : 314.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 214.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез гидрохлорида 1-(4-гидроксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6,7-диола (хигенамина, **64**)

Реакция получения гидрохлорида 1-(4-гидроксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6,7-диола (хигенамина, **64**) представлена на рисунке 3.50.

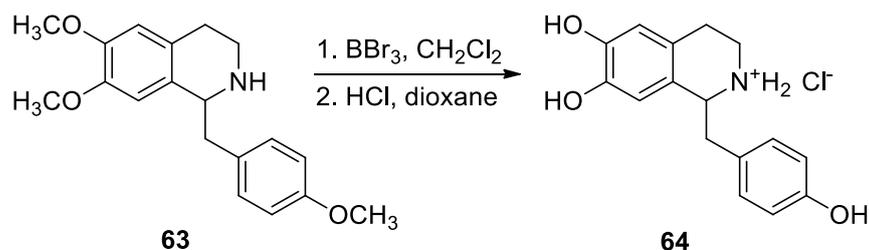


Рисунок 3.50 – Реакция получения гидрохлорида 1-(4-гидроксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6,7-диола (хигенамина, **64**)

Приготовленный раствор 0,1 г (0,3 ммоль) 6,7-диметокси-1-(4-метоксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (**57**) в 10 мл хлористого метилена помещали в трехгорлую колбу. Реакционную массу продували азотом, охлаждали до -78°C , по каплям добавляют 0,5 мл (1,4 г, 5,4 ммоль) трибромид брома. После прибавления всего количества трибромида брома, температуру реакционной массы медленно поднимали до 0°C и выдерживали в течение 4 ч, а затем выливали в 15 мл ледяной воды. Реакционную массу перемешивали в течение 30 мин, добавляли 30 мл этилацетата, отфильтровывали выпавший осадок и промывали его этилацетатом (4 x 25 мл). Объединенные фильтраты упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и получали 0,1 г технического продукта. Технический продукт очищали на полупрепаративном хроматографе. Получали 0,06 г свободного 1-(4-гидроксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6,7-диола, который переводили в гидрохлорид путем добавления 1 мл 3 М раствора хлороводорода в диоксане. Получали 0,07 г (68 %) гидрохлорида 1-(4-гидроксибензил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6,7-диола (хигенамина, **64**) с т.пл. $248-251^{\circ}\text{C}$ с разложением. R_f 0.50 (хлороформ / метанол / аммиак, 10:15:1), желтое пятно после обработки хроматограммы реактивом Эрлиха, с последующей обработкой парами соляной кислоты. Фиолетовое пятно после выдерживания в йодной камере. ^1H ЯМР-спектр, (D_2O , м.д., $J/\text{Гц}$): 2.83-2.88 (м, 2H, CH_2), 2.90-2.96, 3.32-3.35 (м, д.д, 2H, CH_2 , $J=5.6$, $J=14.6$), 3.20-3.24, 3.41-3.45 (кв., 2H, CH_2 , $J=6.3$, $J=6.3$), 4.58 (д.д, 1H, CH, $J=5.6$, $J=9.0$), 6.63 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.70 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.83 (д, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.4$), 7.12 (д, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.4$). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 2.66-2.94 (м, 2H, CH_2CHO), 2.96-3.21 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.36-4.56 (м, 1H, CHN), 6.49 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.54 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.63-6.86 (м, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 6.99-7.21 (м, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 9.01 (уш.с, 1H, OH), 9.09 (уш.с, 1H, OH), 9.40 (уш.с, 1H, OH). ^{13}C ЯМР-спектр (D_2O , м.д.): 24.03 (CH_2), 38.37 (CH_2), 39.25 (CH_2), 56.20 (CH), 113.88 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 115.80 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 115.92 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 123.80 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 123.83 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 126.78 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 130.94 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 142.84 ($\text{C}_{\text{аром-OH}}$), 144.07 ($\text{C}_{\text{аром-OH}}$), 154.98 ($\text{C}_{\text{аром-OH}}$). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 24.73 (CH_2), 39.13 (CH_2), 39.43 (CH_2), 55.74 (CH), 114.12 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 115.70 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 115.91 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 122.94 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 123.32 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 126.57 ($\text{C}_{\text{аром}}$), 131.06 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 144.43 ($\text{C}_{\text{аром-OH}}$), 145.49 ($\text{C}_{\text{аром-OH}}$), 156.90 ($\text{C}_{\text{аром-OH}}$). Масс-спектр (ESI), m/z : 272.1284 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 272.1281 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.2 Синтез 2-амино-2-арилэтанолов

3.1.2.1 Синтез 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов, изомерных аналогов кленпроперола и кленпентерола

Синтез 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанола (65)

Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанола (65) представлена на рисунке 3.51.

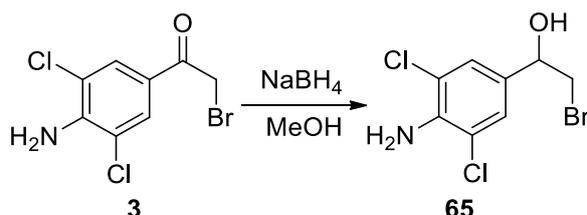


Рисунок 3.51 – Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанола (65)

К суспензии 3,8 г (13 ммоль) 4-амино-3,5-дихлор-2'-бромацетофенона (3) в 50 мл метанола при минус 10 °С прибавляли в течение 15 мин порциями 0,3 г (7 ммоль) борогидрида натрия. Реакционную массу перемешивали в течение 30 мин при минус 10°С и выливали в 200 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 20 мл воды и высушивали на воздухе. Получали 3,6 г (94 %) 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанола (65) в виде белых кристаллов.). ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 3.86-3.91 (м, 2H, CH₂), 4.72-4.77 (м, 1H, СНОН), 5.71 (уш.с, 2H, NH₂), 7.25 (д, 2H, СНаром, J=0.83), 9.59 (с, 1H, ОН).

Синтез гидрохлорида 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(изопропиламино)этанола (66а) и гидрохлорида 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(трет-пентиламино)этанола (66б). Общая методика.

Реакция получения гидрохлоридов 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанола (66а,б) представлена на рисунке 3.52.

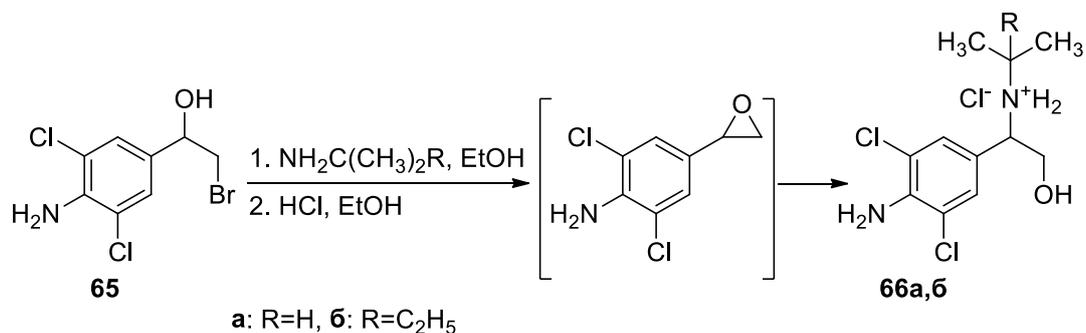


Рисунок 3.52 – Реакция получения гидрохлоридов 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанол (66а,б)

Смесь 1,7 г (6 ммоль) 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанол (65), 2,5 мл (1,7 г, 30 ммоль) изопропиламина или 3,4 мл (2,6 г, 30 ммоль) *трет*-пентиламина и 15 мл этанола перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную массу разбавляли 50 мл этилацетата и экстрагировали 1 М соляной кислотой (3 x 30 мл). Объединенные водные фазы промывали 50 мл этилацетата, нейтрализовали, добавляя порциями карбонат калия до рН=9, и экстрагировали этилацетатом (2 x 30 мл). Органическую фазу высушивали над сульфатом магния, упаривали растворитель на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищали методом колоночной хроматографии, элюент: хлороформ/метанол, 15:1. Полученный после хроматографической очистки маслообразный продукт растворяли в 2 мл метанола, прибавляли 0,6 мл 6 М раствора хлороводорода в этаноле и высаживали гидрохлорид прибавлением 50 мл эфира. Получали 1,0 г (53 %) гидрохлорида 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(изопропиламино)этанол (66а) в виде порошка белого цвета с т.пл. 190-193 °С (с разложением), или 0,6 г (31 %) гидрохлорида 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанол (66б) в виде белых кристаллов с т.пл. 203-204 °С (с разложением). ¹Н ЯМР-спектр 66а, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 21.21 (д, 3H, CH₃, J=6.6), 1.28 (д, 3H, CH₃, J=6.6), 3.05 (т, 1H, NCH, J=6.6), 3.76 (д.д, 1H, CH₂N, J=11.0, 5.2), 3.86 (д.д, 1H, CH₂N, J=11.0, 5.8), 4.14-4.35 (м, 1H, OCH), 5.58 (уш.с, 3H, NH₂ и OH), 7.60 (с, 2H, 2CHаром), 9.08 и 9.185 (2уш.с, 2H, NH₂). ¹Н ЯМР-спектр 66б, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 20.78 (т, 3H, CH₃CH₂, J=7.4), 1.16 (с, 3H, CH₃), 1.22 (с, 3H, CH₃), 1.64 (т, 2H, CH₃CH₂, J=7.7), 3.63-3.84 (м, 2H, CH₂N), 4.26-4.40 (м, 1H, CHO), 5.66 (уш.с, 3H, OH и NH₂), 7.59 (с, 2H, 2CHаром), 8.57 (уш.с, 1H, NH), 8.75 (уш.с, 1H, NH). ¹³С ЯМР-спектр 66а (d₆-DMSO, м.д.): 18.12 (CH₃), 19.76 (CH(CH₃)₂), 59.38 (CHNH), 62.63 (CH₂OH), 118.34 (C^{2,6}), 122.56 (C^{3,5}), 126.86 (C¹), 142,12 (C⁴). ¹³С ЯМР-спектр 66б (d₆-DMSO, м.д.):

8.40, 23.66 (CH₃), 30.85 (C(CH₃)₂C₂H₅), 58.49 (CH₂CH₃), 62.35 (CHNH), 63.68 (CH₂OH), 118.10 (C^{2,6}), 127.74 (C^{3,5}), 128.96 (C¹), 141.91 (C⁴). Масс-спектр **66a** (ESI), m/z: 263.0712 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 263.0712 [M+H]⁺. Масс-спектр **66b** (ESI), m/z: 291.1023 [M+H]⁺. Вычислено, m/z: 291.1025 [M+H]⁺.

3.1.2.2 Синтез 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола, изомерного аналога циматерола

Синтез 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-бромэтанола (**67**)

Реакция получения 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-бромэтанола (**67**) представлена на рисунке 3.53.

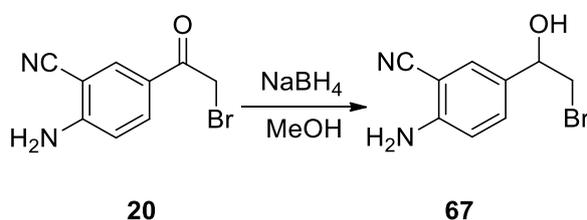


Рисунок 3.53 – Реакция получения 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-бромэтанола (**67**)

Суспензию 3,0 г (12,5 ммоль) 4-амино-3-циано-2'-бромацетофенона (**20**) в 50 мл метанола охлаждали до минус 10 – минус 15 °С и небольшими порциями прибавляли к ней 0,3 г (8 ммоль) боргидрида натрия. Реакционную массу перемешивали при минус 10°С 30 мин, затем еще 2 ч при комнатной температуре. Упаривали спирт на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к остатку приливали 100 мл воды и экстрагировали полученную смесь этилацетатом (3 x 50 мл). Объединенные органические фракции высушивали над сульфатом магния, упаривали, остаток очищали методом колоночной хроматографии, элюент: хлористый метилен / метанол, 10:1. Получали 2,3 г (75 %) 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-бромэтанола (**67**). ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 3.88-3.93 (м, 2H, CH₂), 4.82-4.85 (м, 1H, CHOH), 5.49 (уш.с, 2H, NH₂), 6.44 (д.д, 1H, CHаром, J=0.83, J=8.77), 7.08 (д.д, 1H, CHаром, J=0.43, J=8.77), 7.44 (д.д, 1H, CHаром, J=0.83, J=0.45), 9.72 (с, 1H, OH).

Синтез гидрохлорида 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (68)

Реакция получения гидрохлорида 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**) представлена на рисунке 3.54.

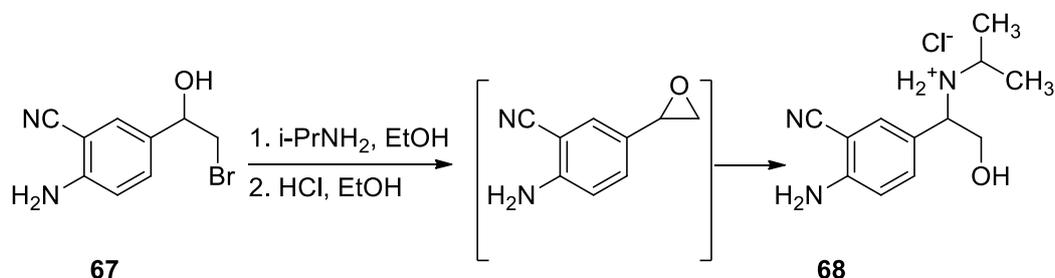


Рисунок 3.54 – Реакция получения гидрохлорида 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**)

Раствор 2,3 г (9,5 ммоль) 1-(4-амино-3-цианофенил)-2-бромэтанола (**67**) и 2,8 г (47,5 ммоль) изопропиламина в 150 мл этанола перемешивали при комнатной температуре 60 ч. Реакционную массу упаривали, остаток выливали в 200 мл воды, прибавляли к нему 3,0 г (22 ммоль) карбоната калия, экстрагировали полученный раствор этилацетатом (3 x 80 мл), промывали объединенные экстракты 100 мл воды и рассолом (3 x 75 мл), высушивали над сульфатом магния и упаривали. Остаток хроматографировали, градиентное элюирование – исходный элюент: хлористый метилен / метанол, 20:1, далее хлористый метилен / метанол, 10:1, 5:1, 3:1. Полученный в виде масла целевой продукт (свободное основание) растворяли в 20 мл абсолютного этанола и прибавляли к нему 3,5 мл 3 М раствора соляной кислоты в этиловом спирте. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получали 1,0 г (50 %) гидрохлорида 2-(4-амино-3-цианофенил)-2-(изопропиламино)этанола (**68**) с т.пл. 159-161°C. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.12 (д, 6H, 2CH_3), 2.78 (д, 2H, CH_2), 2.83 (м, 1H, CH), 4.42-4.51 (м, 5H), 7.66 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=5.0$), 8.51 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=5.0$), 8.61 (д, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=2.0$). ^{13}C ЯМР-спектр, ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д.): 22.47 (CH_3), 24.71 (CH_3), 45.79 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 61.11 (CH), 66.83 (CH_2), 93.53 (C^3), 115.60 (C^5), 118.89 (CN), 130.89 (C^1), 131.31 (C^6), 133.90 (C^2), 151.06 (C^4). Масс-спектр (ESI), m/z : 220.2909 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. Вычислено, m/z : 220.2902 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

3.1.2.3 Синтез гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (трантинтерола) и гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанола, изомерных аналогов мабутерола и мапентерола

Синтез 4-йод-2-(трифторметил)анилина (**70**)

Реакция получения 4-йод-2-(трифторметил)анилина (**70**) представлена на рисунке 3.55.

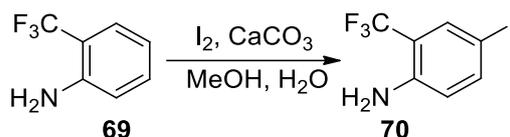


Рисунок 3.55 – Реакция получения 4-йод-2-(трифторметил)анилина (**70**)

Смесь 40,0 г (250 ммоль) 2-(трифторметил)анилина (**69**), 126,0 г (500 ммоль) йода и 49,6 г (500 ммоль) карбоната кальция в 800 мл метанола и 300 мл воды перемешивали при комнатной температуре в течение 80 ч. К реакционной массе прибавляли 250 мл 60 % раствора тиосульфата натрия, перемешивали, отфильтровывали и отгоняли спирт на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Оставшийся водный раствор экстрагировали хлороформом (3 x 150 мл), экстракт промывали водой (2 x 200 мл), высушивали над сульфатом натрия и упаривали. Получали 52,4 г (73 %) 4-йод-2-(трифторметил)анилина (**70**) в виде коричневого масла. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., $J/\text{Гц}$): 5.62 (уш.с, 2H, NH_2), 6.69 (д.д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J=0.77$, $J=8.59$), 7.39 (д.д., 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J=0.43$, $J=8.50$), 7.74 (д.д.д, 1H, $\text{C}_{\text{Hаром}}$, $J=0.74$, $J=0.45$, $J=5.11$).

Синтез 4-амино-3-(трифторметил)бензонитрила (**71**)

Реакция получения 4-амино-3-(трифторметил)бензонитрила (**71**) представлена на рисунке 3.56.

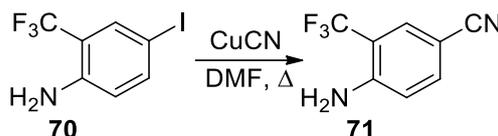


Рисунок 3.56 – Реакция получения 4-амино-3-(трифторметил)бензонитрила (**71**)

Раствор 40,0 г (140 ммоль) 4-йод-2-(трифторметил)анилина (**70**) и 22,5 г (250 ммоль) цианида меди в 300 мл диметилформамида кипятили в течение 6 ч.

Реакционную смесь охлаждали до 100 °С и выливали в 500 мл воды, полученный раствор фильтровали, осадок на фильтре промывали 200 мл этилацетата, фильтрат экстрагировали этилацетатом (3 x 100 мл). Объединенные органические фазы промывали водой (3 x 200 мл), высушивали над сульфатом натрия и упаривали. Получали 10,4 г (40 %) 4-амино-3-(трифторметил)бензонитрила (**71**) в виде желтого масла. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 5.68 (уш.с, 2H, NH₂), 6.88 (д.д, 1H, С_{Наром}, J=0.70, J=8.57), 7.60 (д.д, 1H, С_{Наром}, J=0.52, J=8.52), 7.94 (д.д.д, 1H, С_{Наром}, J=0.69, J=0.55, J=5.00).

Синтез 4-амино-3-(трифторметил)бензойной кислоты (**72**)

Реакция получения 4-амино-3-(трифторметил)бензойной кислоты (**72**) представлена на рисунке 3.57.

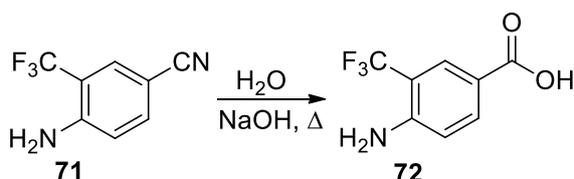


Рисунок 3.57 – Реакция получения 4-амино-3-(трифторметил)бензойной кислоты (**72**)

Суспензию 10,0 г (54 ммоль) 4-амино-3-(трифторметил)бензонитрила (**71**) в 100 мл 20 % раствора гидроксида натрия кипятили в течение 3 ч. Реакционную массу подкисляли соляной кислотой, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (3 x 200 мл), спиртом (3 x 50 мл) и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получали 8,8 г (80 %) 4-амино-3-(трифторметил)бензойной кислоты (**72**) в виде бесцветных кристаллов. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 5.71 (уш.с, 2H, NH₂), 6.94 (д.д, 1H, С_{Наром}, J=0.81, J=8.79), 7.52 (д.д, 1H, С_{Наром}, J=0.52, J=8.84), 7.79 (д.д.д, 1H, С_{Наром}, J=0.84, J=0.49, J=4.92), 9.81 (с, 1H, OH).

Синтез 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензойной кислоты (**73**)

Реакция получения 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензойной кислоты (**73**) представлена на рисунке 3.58.

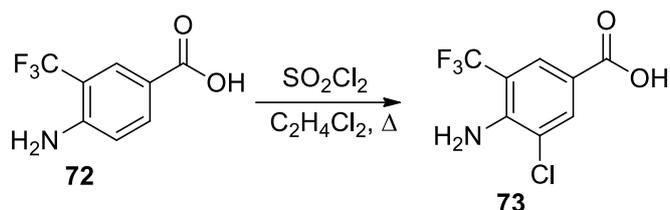


Рисунок 3.58 – Реакция получения 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензойной кислоты (**73**)

Смесь 8,0 г (40 ммоль) 4-амино-3-(трифторметил)бензойной кислоты (**72**) и 5,1 г (52 ммоль) сульфурилхлорида в 100 мл дихлорэтана кипятили с обратным холодильником, защищенным хлоркальциевой трубкой, в течение 6 ч. По истечении этого времени реакционную массу охлаждали, промывали водой, высушивали над сульфатом магния и упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Получали 4,8 г (50 %) 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензойной кислоты (**73**) в виде желтоватых кристаллов. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 5.69 (уш.с, 2H, NH₂), 6.94 (д, 1H, СНаром, $J=0.92$), 7.79 (д.д, 1H, СНаром, $J=0.89$, $J=5.03$), 9.98 (с, 1H, OH).

Синтез 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензоил хлорида (**74**)

Реакция получения 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензоил хлорида (**74**) представлена на рисунке 3.59.

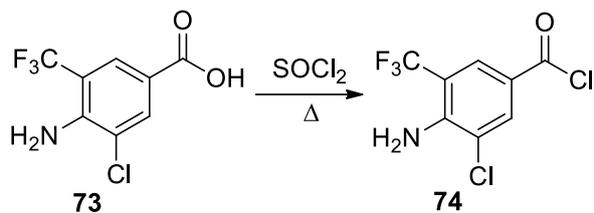


Рисунок 3.59 – Реакция получения 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензоил хлорида (**74**)

Суспензию 13,0 г (54 ммоль) 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензойной кислоты (**73**) в 32,5 мл тионилхлорида нагревали при 60 °С и кипятили в течение 2 ч. Реакционную массу охлаждали, упаривали, растворяли остаток в 150 мл хлороформа, фильтровали, фильтрат упаривали и получали 11,1 г (80 %) 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензоил хлорида (**74**). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 5.39 (уш.с, 2H, NH₂), 8.15 (д, 1H, СНаром, $J=1.02$), 8.19 (д.д, 1H, СНаром, $J=1.00$, $J=5.02$).

Синтез 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)этанона (75)

Реакция получения 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)этанона (75) представлена на рисунке 3.60.

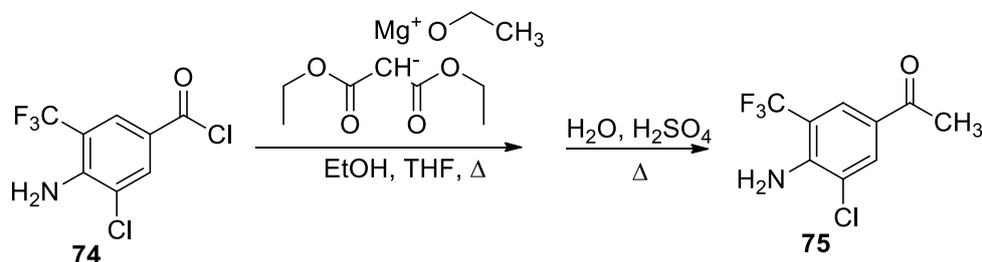


Рисунок 3.60 – Реакция получения 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)этанона (75)

1,3 г (53,5 ммоль) магниевой стружки, 1,6 мл абсолютного этанола и 0,1 мл четыреххлористого углерода перемешивали при комнатной температуре 10 мин, нагревали до кипения и медленно прибавляли 14,6 мл абсолютного тетрагидрофурана. Далее к реакционной смеси при нагревании и перемешивании прибавляли по каплям в течение 1 ч смесь 8,1 мл (8,7 г, 53 ммоль) диэтилмалоната, 4,8 мл абсолютного этанола и 5,6 мл тетрагидрофурана. Полученную смесь кипятили 2 ч. К реакционной смеси прибавляли по каплям в течение 30 мин раствор 13,1 г (51 ммоль) 4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)бензоил хлорида (74) в 44 мл тетрагидрофурана и еще 2 ч кипятили с обратным холодильником. После охлаждения к реакционной смеси прибавляли по каплям серную кислоту до значения pH=2. Органическую фазу отделяли, упаривали, прибавляли к ней смесь 45,8 мл уксусной кислоты, 30,6 мл воды и 5,7 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратным холодильником 5 ч. Полученную смесь упаривали, растворяли остаток в 100 мл хлороформа, приливали 200 мл холодной воды и подщелачивали 50 %-ным раствором гидроксида натрия до значения pH=8. Органическую фазу отделяли, промывали водой (3 x 150 мл), высушивали над сульфатом натрия и упаривали. Получали 10,1 г (80 %) 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)этанона (75) в виде кристаллов с т.пл. 120-123°C, ср. лит [113] т. пл. 120-130°C. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 2.36 (с, 3H, CH₃), 5.44 (уш.с, 2H, NH₂), 7.78 (д, 1H, CHаром, J=1.05), 8.24 (д.д, 1H, dCHаром, J=1.07, J=5.22).

Синтез 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)-2-бромэтанона (76)

Реакция получения 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)-2-бромэтанона (76) представлена на рисунке 3.61.

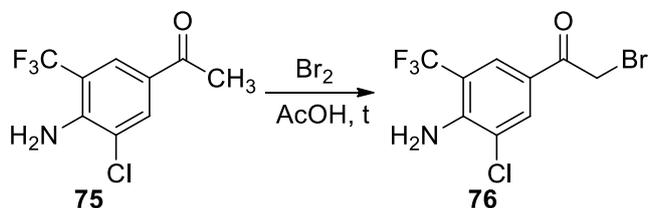


Рисунок 3.61 – Реакция получения 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)-2-бромэтанона (76)

К раствору 8,5 г (36 ммоль) 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)этанона (75) в 85 мл ледяной уксусной кислоты при 45-50 °С прибавляли по каплям раствор 2,0 мл (39 ммоль) брома в 17 мл уксусной кислоты. Реакционную смесь 30 мин перемешивали при 50 °С, охлаждали, отгоняли в вакууме уксусную кислоту, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (3 x 100 мл), водой (2 x 100 мл), высушивали над сульфатом натрия и упаривали. Полученный технический продукт перекристализовывали из смеси толуола и циклогексана. Получали 5,6 г (50 %) 1-(4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил)-2-бромэтанона (76) в виде бесцветных кристаллов с т.пл. 113-115⁰С, ср. лит [113] т.пл. 113-115⁰С. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 4.93 (с, 2Н, CH₂), 5.51 (уш.с, 2Н, NH₂), 7.78 (д, 1Н, СНаром, J=1.00), 8.24 (д.д, 1Н, СНаром, J=1.01, J=5.12).

Синтез 2-хлор-4-оксиран-2-ил-6-(трифторметил)анилина (77)

Реакция получения 2-хлор-4-оксиран-2-ил-6-(трифторметил)анилина (77) представлена на рисунке 3.62.

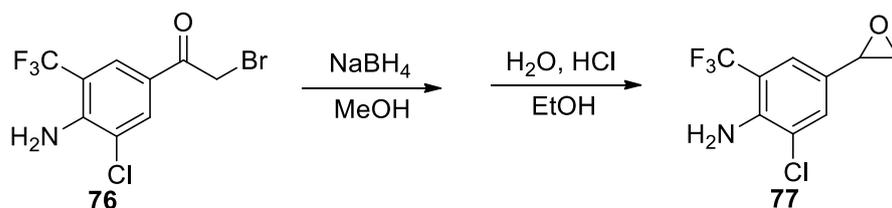


Рисунок 3.62 – Реакция получения 2-хлор-4-оксиран-2-ил-6-(трифторметил)анилина (77)

В 50 мл метанола растворяли 4,1 г (13 ммоль) 1-[4-амино-3-хлор-5-(трифторметил)фенил]-2-бромэтанона (76) и охлаждали до минус 10 – минус 15 °С. К

раствору в течение 30 мин прибавляли небольшими порциями 0,5 г (14 ммоль) борогидрида натрия так, чтобы температура реакционной смеси не превышала минус 10 °С. Реакционную массу перемешивали при минус 15°С еще 1 ч, далее подкисляли 2 М раствором соляной кислоты и упаривали метанол в вакууме. Оставшийся водный раствор подщелачивали водным раствором аммиака, экстрагировали этилацетатом (3 x 50 мл), экстракт промывали водой (2 x 30 мл), высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и прибавляли к нему 3 мл 3 М спиртового раствора хлористого водорода. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получали 1,2 г (27 %) 2-хлор-4-оксиран-2-ил-6-(трифторметил)анилина (**77**). ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 2.82-3.01 (м, 2H, CH₂), 4.08 (д, 1H, CH, J=3.38), 5.44 (уш.с, 2H, NH₂), 7.38 (д, 1H, CHаром, J=1.77), 7.49 (д,д, 1H, CHаром, J=1.92, J=5.02).

Синтез гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(трет-бутиламино)этанол (трантинтерола, 78а) и гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(трет-пентиламино)этанол (78б). Общая методика.

Реакция получения гидрохлоридов 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(алкиламино)этанолов (**78а,б**) представлена на рисунке 3.63.

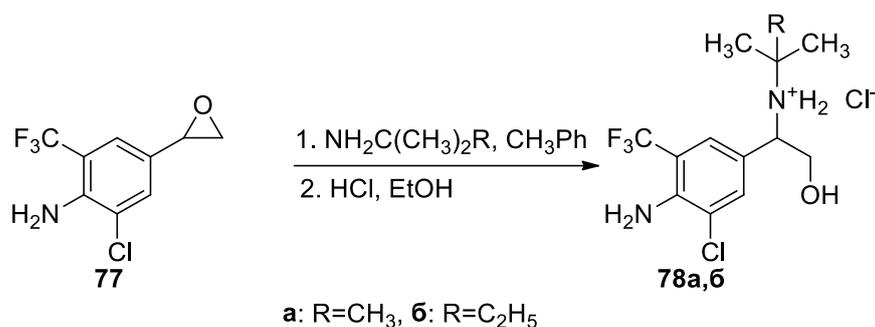


Рисунок 3.63 – Реакция получения гидрохлоридов 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(алкиламино)этанолов (**78а,б**)

Суспензию 4,3 г (18 ммоль) 2-хлор-4-оксиран-2-ил-6-(трифторметил)анилина (**77**) и 3,3 г (44,5 ммоль) трет-бутиламина или 3,9 г (44,5 ммоль) трет-амиламина в толуоле перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную массу фильтровали, к фильтрату приливали 6 мл 3 М спиртового раствора соляной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали гексаном (2 x 30 мл), тетрагидрофураном (2 x 30 мл) и высушивали в эксикаторе над фосфорным ангидридом.

Получали 1,5 г (25 %) гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этанола (трантинтерола, **78a**) или 1,7 г (27 %) гидрохлорида 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанола (**78б**). ^1H ЯМР-спектр **78a**, ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д., $J/\text{Гц}$): 1.30 (с, 9H, 3CH_3), 2.80 (д, 2H, CH_2), 4.51 (м, 1H, CH), 5.12 (уш.с, 2H, NH и OH), 8.31 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Наром}}$, $J=2.0$), 8.62 (с, 6H, $\text{C}_{\text{Наром}}$). ^1H ЯМР-спектр **78б**, ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д., $J/\text{Гц}$): 0.92 (м, 3H, CH_3CH_2), 0.98 (с, 6H, 2CH_3), 1.13 (м, 1H, CH_2CH_3), 2.82 (д, 2H, CH_2NH), 4.64–4.82 (м, 5H), 8.23 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Наром}}$, $J=2.0$), 8.60 (д, 1H, $\text{C}_{\text{Наром}}$, $J=2.0$). ^{13}C ЯМР-спектр **78a** ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д.): 30.34 (3CH_3), 51.11 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.85 (CH), 67.27 (CH_2), 112.59 (C^3), 119.51 (C^5), 124.29 (CF_3), 132.45 (C^6), 134.42 (C^1), 140.55 (C^4). ^{13}C ЯМР-спектр **78б** ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д.): 8.64 (CH_2CH_3), 27.54 (CH_3), 28.04 (CH_3), 34.21 (CH_2CH_3), 53.27 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.39 (CH), 67.33 (CH_2), 112.56 (C^3), 119.47 (C^5), 124.26 (C^2), 124.30 (CF_3), 134.46 (C^6), 140.54 (C^1), 140.54 (C^4). Масс-спектр **78a** (ESI), m/z : 311.7501 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 311.7504 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Масс-спектр **78б** (ESI), m/z : 325.7770 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 325.7770 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.3 Синтез метаболитов

3.1.3.1 Синтез (4-амино-3,5-дибромфенил)гидроксиуксусной кислоты (метаболита бромбутерола) и (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (метаболита кленбутерола)

Синтез 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2,2-дибромэтанона (**79**)

Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2,2-дибромэтанона (**79**) на рисунке 3.64.

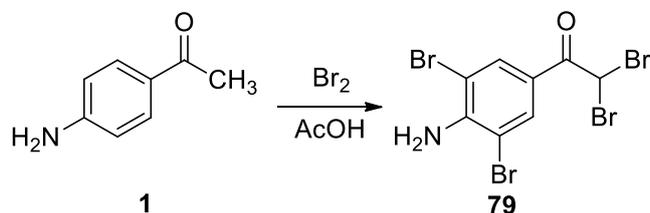


Рисунок 3.64 – Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2,2-дибромэтанона (**79**)

К раствору 13,5 г (100 ммоль) 4-аминоацетофенона (**1**) в 400 мл уксусной кислоты при интенсивном перемешивании в течение 10 мин добавляли 22,8 мл (70,0 г, 440 ммоль) брома, что сопровождалось разогревом реакционной массы до температуры 50-60 °С. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч,

выпавший осадок отфильтровывали и суспендировали в 300 мл воды. К суспензии при интенсивном перемешивании добавляли порциями карбонат калия до тех пор, пока значение pH водной фазы не стало равным 8. Осадок отфильтровывали, тщательно перемешивали и промывали метанолом (3 x 150 мл), высушивали на воздухе. Получали 15,8 г (35 %) 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2,2-дибромэтанона (**79**). ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 6.42 (уш.с, 2H, NH_2), 7.72 (с, 1H, CHBr_2), 8.12 (с, 2H, CHаром).

Синтез (4-амино-3,5-дибромфенил)гидроксиуксусной кислоты (**80a**)

Реакция получения (4-амино-3,5-дибромфенил)гидроксиуксусной кислоты (**80a**) на рисунке 3.65.

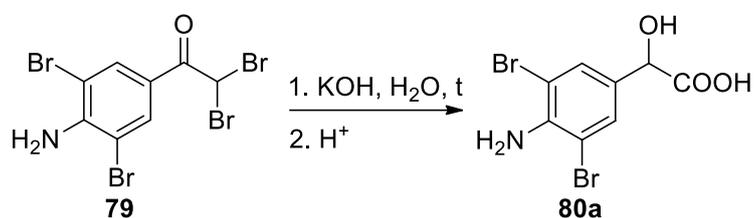


Рисунок 3.65 – Реакция получения (4-амино-3,5-дибромфенил)гидроксиуксусной кислоты (**80a**)

К раствору 40,0 г (710 ммоль) гидроксида калия в 200 мл воды при температуре 60 °С и интенсивном перемешивании в один прием прибавляли 15,8 г (35 ммоль) 1-(4-амино-3,5-дибромфенил)-2,2-дибромэтанона (**79**). После этого перемешивали реакционную массу в течение 1 ч при 60 °С и 1 ч при 90 °С, охлаждали и медленно подкисляли при перемешивании концентрированной серной кислотой до pH=4. После охлаждения реакционную массу отфильтровывали, осадок нагревали до кипения при перемешивании с 300 мл воды и отфильтровывали горячий раствор. Фильтрат оставляли на ночь при комнатной температуре, выпавший осадок отфильтровывали и кипятили при перемешивании в течение 10 мин с 200 мл воды и 0,5 г активированного угля. Полученную смесь отфильтровывали горячей и фильтрат охлаждали. Выпавший из него осадок отфильтровывали и высушивали на воздухе. Получали 3,0 г (26 %) (4-амино-3,5-дибромфенил)гидроксиуксусной кислоты (**80a**) с т. пл. 154-155 °С. ^1H ЯМР-спектр, (d_6 -DMSO, м.д., J/Гц): 4.88 (с, 1H, CH), 5.25 (уш.с, 2H, NH_2), 7.44 (с, 2H, CHаром). ^{13}C ЯМР-спектр (d_6 -DMSO, м.д.): 71.18 (CHOH), 107.63 ($\text{C}^{3,5}$), 130.57 ($\text{C}^{2,6}$), 131.03 (C^1), 142.77 (C^4), 174.30 (COOH). Масс-спектр (ESI), m/z: 323.9461 $[\text{M-H}]^-$. Вычислено, m/z: 323.9466 $[\text{M-H}]^-$.

Синтез 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2,2-дибромэтанона (81)

Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2,2-дибромэтанона (81) на рисунке 3.66.

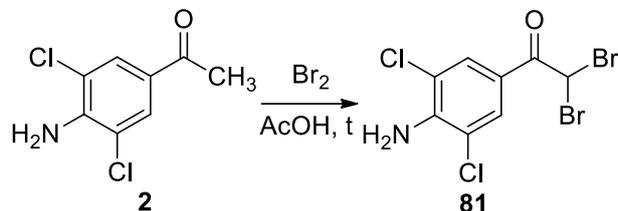


Рисунок 3.66 – Реакция получения 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2,2-дибромэтанона (81)

Суспензию 2,0 г (10 ммоль) 4-амино-3,5-дихлорацетофенона (2) в 8 мл уксусной кислоты нагревали до 60 °С и прибавляли к ней раствор 0,5 мл (1,6 г, 10 ммоль) брома в 2 мл уксусной кислоты. После растворения исходного 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)этанона и выпадения осадка 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-бромэтанона к реакционной массе прибавляли ещё 0,5 мл (1,6 г, 10 ммоль) брома в 2 мл уксусной кислоты. После прибавления реакцию массу выдерживали 30 мин при 60 °С, охлаждали и фильтровали. Осадок суспендировали в 25 мл 10 %-го водного раствора карбоната калия, отфильтровывали и перекристаллизовывали из 25 мл изопропилового спирта. Получали 2,2 г (61 %) 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2,2-дибромэтанона (81) в виде желтоватых кристаллов с т. пл. 140-142 °С. ¹Н ЯМР-спектр, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 5.15 (уш.с, 2H, NH₂), 6.53 (с, 1H, CHBr₂), 7.98 (с, 2H, CHаром).

Синтез (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (806)

Реакция получения (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (806) на рисунке 3.67.

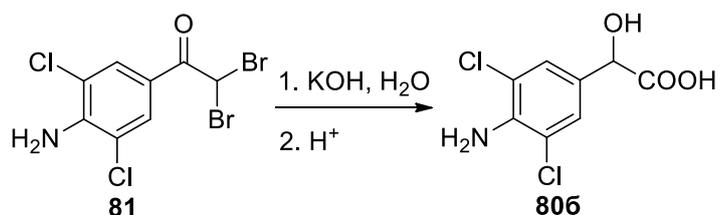


Рисунок 3.67 – Реакция получения (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (806)

Раствор 3,6 г (55 ммоль) гидроксида калия в 16 мл воды нагревали до 60 °С и порциями прибавляли к нему 1,0 г (3 ммоль) 1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2,2-

дибромэтанола (**81**). Прибавление вели с такой скоростью, чтобы температура реакционной массы оставалась в интервале 55-65 °С. По окончании прибавления выдерживали смесь при 60 °С 1 ч, 1,5 ч при температуре 90 °С, охлаждали до комнатной температуры и подкисляли концентрированной серной кислотой до pH=4. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой (3 x 10 мл). Маточный раствор и промывные воды объединяли и экстрагировали эфиром (3 x 15 мл). Эфирный экстракт высушивали над безводным сульфатом магния, растворитель удаляли на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток после удаления растворителя объединяли с ранее отфильтрованным осадком. Получали 0,3 г (42 %) (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (**806**) с т.пл. 158-159 °С. Продукт дополнительно очищали методом нормальнофазной градиентной колоночной хроматографии, элюент: метанол / хлороформ, от 1:5 до 1:2. Получали 0,2 г (28 %) (4-амино-3,5-дихлорфенил)гидроксиуксусной кислоты (**806**) с т.пл. 160-161 °С. ¹H ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 3.82 (уш.с, 2H, OH и COOH), 4.90 (с, 1H, CH), 5.51 (с, 2H, NH₂), 7.26 (с, 2H, CHаром). ¹³C ЯМР-спектр (d₆-DMSO, м.д.): 71.43 (CHOH), 118.14 (C^{3,5}), 126.72 (C^{2,6}), 129.53 (C¹), 141.09 (C⁴), 174.03 (COOH). Масс-спектр (ESI), m/z: 233.9739 [M-H]⁻. Вычислено, m/z: 233.9730 [M-H]⁻.

3.1.3.2 Синтез N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (метаболита бромбутерола) и N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (метаболита кленбутерола)

Синтез 4-амино-3,5-дибромбензойной кислоты (**83a**)

Реакция получения 4-амино-3,5-дибромбензойной кислоты (**83a**) на рисунке 3.68.

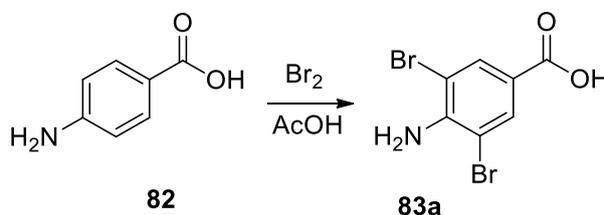


Рисунок 3.68 – Реакция получения 4-амино-3,5-дибромбензойной кислоты (**83a**)

В 400 мл ледяной уксусной кислоты суспендировали 13,7 г (100 ммоль) 4-аминобензойной кислоты (**82**). При интенсивном перемешивании к полученной смеси в один прием приливали 12,9 мл (40,0 г, 250 ммоль) брома и перемешивали в течение 1 ч

при комнатной температуре, а затем в течение 2 ч при 70 °С. После этого реакционную массу охлаждали, осадок отфильтровывали и последовательно промывали 100 мл уксусной кислоты и водой (3 x 300 мл). Продукт высушивали на воздухе и получали 27,8 г 4-амино-3,5-дибромбензойной кислоты, которая, согласно спектру ПМР содержала примесь (5-10 %) 4-амино-3-бромбензойной кислоты. Неочищенный продукт перекристаллизовывали из 500 мл диоксана. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали метанолом и высушивали на воздухе. Получают 19,5 г (66 %) 4-амино-3,5-дибромбензойной кислоты (**83а**) с т.пл. более 350 °С. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 6.10 (с, 2H, NH₂), 7.90 (с, 2H, 2СНаром), 12.78 (с, 1H, COOH).

Синтез 4-амино-3,5-дихлорбензойной кислоты (**83б**)

Реакция получения 4-амино-3,5-дихлорбензойной кислоты (**83б**) на рисунке 3.69.

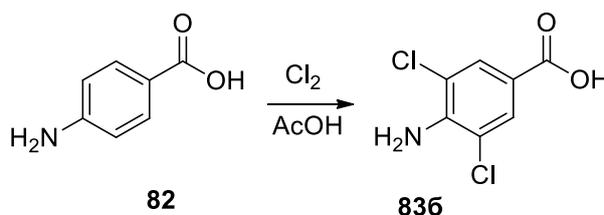


Рисунок 3.69 – Реакция получения 4-амино-3,5-дихлорбензойной кислоты (**83б**)

К суспензии 5,5 г (40 ммоль) 4-аминобензойной кислоты (**82**) в 50 мл уксусной кислоты без охлаждения прибавляли по каплям в течение 30 мин 68 мл 1,25 М раствора хлора в уксусной кислоте и оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре. Реакционную массу выливали в 300 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из этанола. Получали 2,6 г (32 %) 4-амино-3,5-дихлорбензойной кислоты (**83б**) с т.пл. более 300 °С. ¹Н ЯМР-спектр, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 6.30 (с, 2H, NH₂), 7.71 (с, 2H, СНаром), 12.74 (с, 1H, OH).

Синтез этилового эфира N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (84а) и этилового эфира N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (84б). Общая методика.

Реакция получения этиловых эфиров N-(4-амино-3,5-дигалогенбензоил)аминоуксусной кислоты (**84а,б**) на рисунке 3.70.

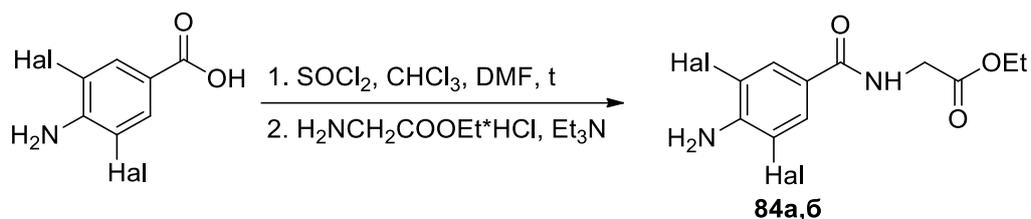


Рисунок 3.70 – Реакция получения этиловых эфиров N-(4-амино-3,5-дигалогенбензоил)аминоуксусной кислоты (**84a,b**)

К суспензии 1,5 г (5 ммоль) 4-амино-3,5-дибромбензойной кислоты (**83a**) или 1,0 г (5 ммоль) 4-амино-3,5-дихлорбензойной кислоты (**83б**) в 10 мл хлороформа добавляли 0,4 мл (0,65 г, 5,5 ммоль) тионилхлорида и одну каплю ДМФА. Смесь кипятили при перемешивании в течение 2 ч, при этом наблюдалась ее гомогенизация. Реакционную массу охлаждали и добавляли 0,7 г (5 ммоль) гидрохлорида этилового эфира глицина и 1,5 мл (1,1 г, 11 ммоль) триэтиламина и перемешивают в течение ночи. Полученную реакцию массу последовательно встряхивали с 10 мл воды, 10 мл 5 %-ной соляной кислоты, 10 мл 5 %-ного раствора карбоната калия. Органическую фазу отделяли, высушивали над сульфатом натрия и упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток нагревали до кипения и полного растворения с 50 мл этанола, полученный раствор упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса до объема 20 мл. Выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Получали 2,2 г (29 %) этилового эфира N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (**84a**) с т.пл. 148-150°C или 0,8 г (55 %) этилового эфира N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (**84б**) с т.пл. 156-157°C. ¹H ЯМР-спектр **84a**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 1.20 (т, 3H, CH₃, J=7.1), 3.94 (д, 2H, CH₂, J=5.8), 4.15 (к, 2H, OCH₂, J=7.1), 5.91 (с, 2H, NH₂), 7.98 (с, 2H, 2CH_{аром}), 8.81 (т, 1H, NH, J=5.8). ¹H ЯМР-спектр **84б**, (CDCl₃, м.д., J/Гц): 1.31 (т, 3H, CH₃, J=6.4), 4.19 (д, 2H, NCH₂, J=4.2), 4.26 (к, 2H, OCH₂, J=6.6), 4.79 (с, 2H, NH₂), 6.52 (уш.с, 1H, CONH), 7.68 (с, 2H, CH_{аром}).

Синтез N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (85a) и N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (85б). Общая методика.

Реакция получения N-(4-амино-3,5-дигалогенбензоил)аминоуксусной кислоты (**85a,b**) на рисунке 3.71.

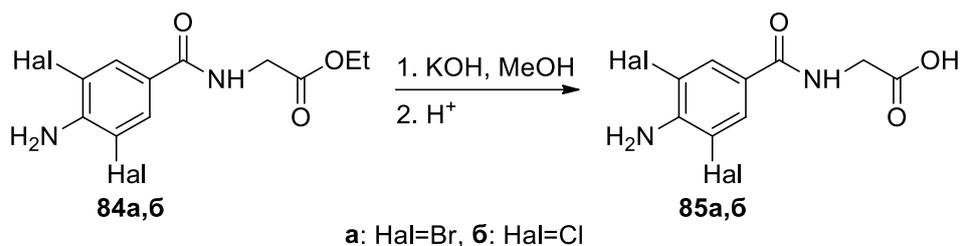


Рисунок 3.71 – Реакция получения N-(4-амино-3,5-дигалогенбензоил)аминоуксусной кислоты (**85а,б**)

К раствору 1,1 г (3 ммоль) этилового эфира N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (**84а**) или 0,8 г (3 ммоль) этилового эфира N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (**84б**) в 10 мл метилового спирта добавляли 0,2 г (3 ммоль) 85 %-ного гидроксида калия, перемешивали в течение ночи. Растворитель отгоняли на РПИ в вакууме водоструйного насоса.

Для получения N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (**85а**) к остатку добавляли 50 мл воды и экстрагировали этилацетатом (4 x 50 мл). Водную фазу отделяли, подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH=5, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали на воздухе. Получали 1,0 г (49 %) N-(4-амино-3,5-дибромбензоил)аминоуксусной кислоты (**85а**) с т.пл. 185-187 °С.

Для получения N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (**85б**) к остатку прибавляли 15 мл воды и промывали последовательно 15 мл хлороформа и 10 мл эфира. Водный слой отделяли и подкисляли соляной кислотой до pH=3. Выпавший осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из 30 мл воды. Получали 0,6 г (77 %) N-(4-амино-3,5-дихлорбензоил)аминоуксусной кислоты (**85б**) с т.пл. 196-197 °С. ¹H ЯМР-спектр **85а**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 3.87 (д, 2H, CH₂, J=5.9), 5.92 (с, 2H, NH₂), 7.98 (с, 2H, 2CHаром), 8.73 (т, 1H, NH, J=5.9). ¹H ЯМР-спектр **85б**, (d₆-DMSO, м.д., J/Гц): 3.87 (д, 2H, CH₂, J=5.9), 6.10 (с, 2H, NH₂), 7.79 (с, 2H, CHаром), 8.70 (т, 1H, CONH, J=5.9), 12.56 (с, 1H, OH). ¹³C ЯМР-спектр **85а** (d₆-DMSO, м.д.): 41.61 (NCH₂), 107.04 (C^{3,5}), 123.63 (C¹), 131.69 (C^{2,6}), 146.00 (C⁴), 164.39 (CON), 171.82 (COOH). ¹³C ЯМР-спектр **85б** (d₆-DMSO, м.д.): 41.64 (NCH₂), 117.72 (C^{3,5}), 122.16 (C¹), 127.82 (C^{2,6}), 144.37 (C⁴), 164.70 (CON), 171.84 (COOH). Масс-спектр **85а** (ESI), m/z: 350.9723 [M-H]⁻. Вычислено, m/z: 350.9720 [M-H]⁻. Масс-спектр **85б** (ESI), m/z: 260.9583 [M-H]⁻. Вычислено, m/z: 260.9580 [M-H]⁻.

3.1.3.4 Синтез гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты, метаболита вилантерола

Синтез 2-(2,6-дихлорбензилокси)этанола (87)

Реакция получения 2-(2,6-дихлорбензилокси)этанола (87) на рисунке 3.72.

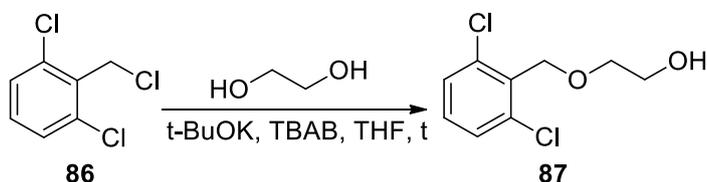


Рисунок 3.72 – Реакция получения 2-(2,6-дихлорбензилокси)этанола (87)

К 37,2 г (600 ммоль) этиленгликоля в 100 мл безводного ТГФ добавляли 6,7 г (60 ммоль) *трет*-бутилата калия, 2,0 г (6 ммоль) тетрабутиламмоний бромида и 11,6 г (60 ммоль) 2,6-дихлорбензилхлорида (86). Смесь кипятили при перемешивании в течение 20 ч, реакционную массу охлаждали, растворитель отгоняли на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток разбавляли 200 мл воды, экстрагировали хлористым метиленом (3 x 30 мл). Органические фазы объединяли, промывали водой (2 x 100 мл), высушивали над сульфатом натрия и упаривали. Остаток разделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент: хлороформ / метанол, 10:1. Получали 9,8 г (74 %) 2-(2,6-дихлорбензилокси)этанола (87) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 3.6 (т, 2Н, CH_2 $J=5.0$), 3.7 (2Н, CH_2 , $J=5.0$), 5.0 (с, 2 Н, CH_2), 6.9 (т, 1Н, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=7.7$), 7.3 (д, 2Н, $\text{CH}_{\text{аром}}$ $J=7.7$). Масс-спектр (ESI), m/z : 221.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 221.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез 2-[2-(6-бромгексило)-этоксиметил]-1,3-дихлорбензола (88)

Реакция получения 2-[2-(6-бромгексилокси)-этоксиметил]-1,3-дихлорбензола (88) на рисунке 3.73.

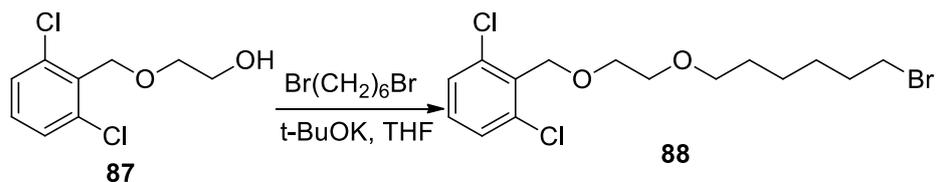


Рисунок 3.73 – Реакция получения 2-[2-(6-бромгексилокси)-этоксиметил]-1,3-дихлорбензола (88)

К раствору 4,4 г (20 ммоль) 2-(2,6-дихлорбензилокси)этанола (**87**) в 80 мл сухого ТГФ добавляли 2,2 г (20 ммоль) *трет*-бутилата калия и 24,4 г (100 ммоль) 1,6-дибромгексана и перемешивали в течение 72 ч. Растворитель отгоняли на РПИ в вакууме водоструйного насоса, к остатку добавляли воду (3 x 50 мл) и отгоняли с водяным паром при пониженном давлении избыточный непрореагировавший 1,6-дибромгексан. Остаток экстрагировали 70 мл хлористого метилена, экстракт упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса и остаток разделяли с помощью препаративного хроматографа. Получали 0,65 г (9 %) 2-[2-(6-бромгексилокси)-этоксиметил]-1,3-дихлорбензола (**88**) в виде желтоватого масла. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.35-1.52 (м, 4H, CH_2), 1.56-1.66 (м, 2H, CH_2), 1.83-1.92 (т, 2H, CH_2), 3.42 (т, 2H, CH_2 , $J=6.6$), 3.49 (т, 2H, CH_2 , $J=6.6$), 3.60-3.67 (м, 2H, CH_2), 3.71-3.76 (м, 2H, CH_2), 4.85 (с, 2H, CH_2), 7.34 (т, 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=7.3$), 7.33 (д, 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.0$). Масс-спектр (ESI), m/z : 385.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 385.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез гидрохлорида *трет*-бутилового эфира глицина

Реакция получения гидрохлорида *трет*-бутилового эфира глицина на рисунке 3.74.

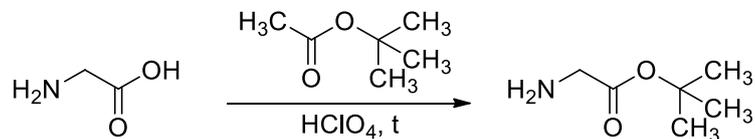


Рисунок 3.74 – Реакция получения гидрохлорида *трет*-бутилового эфира глицина

К 60 мл (53,8 г, 460 ммоль) *трет*-бутилацетата добавляли 0,3 г (4 ммоль) глицина и 0,67 г (4 ммоль) 60 %-хлорной кислоты и перемешивали в течение 96 ч. Реакционную массу переносили в делительную воронку, промывали 20 мл насыщенного раствора карбоната натрия, органическую фазу отделяли, высушивали над сульфатом натрия и упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Остаток растворяли в 10 мл диэтилового эфира и подкисляли насыщенным раствором хлороводорода в изопропанолу до $\text{pH}=6$. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали петролейным эфиром и высушивали на воздухе. Получали 0,15 г (23 %) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира глицина с т. пл. 138-140 °С, ср. лит. [178] т. пл. 140-141 °С.

Синтез *трет*-бутилового эфира (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (89)

Реакция получения *трет*-бутилового эфира (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**89**) на рисунке 3.75.

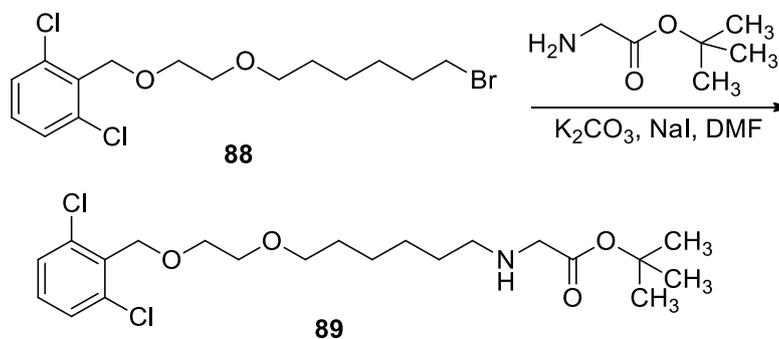


Рисунок 3.75 – Реакция получения *трет*-бутилового эфира (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**89**)

Смесь 0,15 г (1 ммоль) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира глицина, 0,2 г (0,5 ммоль) 2-[2-(6-бромгексилокси)-этоксиметил]-1,3-дихлорбензола (**88**), 0,3 г (2 ммоль) карбоната калия и 0,05 г (0,3 ммоль) йодида натрия перемешивали с 3 мл абсолютного ДМФА в течении 72 ч. ДМФА отгоняли на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток смешивали с 5 мл ацетонитрила, не растворившийся осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток разделяли с помощью препаративного хроматографа. Получали 0,13 г (60 %) *трет*-бутилового эфира (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**89**) в виде желтоватого масла. ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.35-1.45 (м, 2Н, CH_2), 1.50-1.55 (м, 2Н, CH_2), 1.84 (т, 9Н, 3 CH_3), 2.55-2.72 (м, 2Н, CH_2), 3.35-3.41 (м, 2Н, CH_2), 3.50-3.55 (м, 2Н, CH_2), 3.69-3.72 (м, 2Н, CH_2), 3.77-3.80 (м, 2Н, CH_2), 4.86 (с, 2Н, CH_2), 7.23 (т, 1Н, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=7.3$), 7.35 (д, 2Н, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.8$). Масс-спектр (ESI), m/z : 434.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 434.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Синтез гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (метаболита вилантерола, 90)

Реакция получения гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилокси)этокси]гексиламино)уксусной кислоты (**90**) на рисунке 3.76.

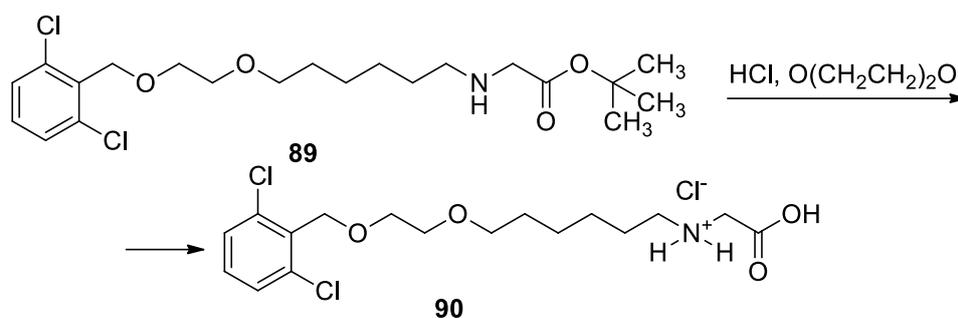


Рисунок 3.76 – Реакция получения гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилоки)этокси]гексиламино)уксусной кислоты (**90**)

0,14 г (0,3 ммоль) *tert*-бутилового эфира (6-[2-(2,6-дихлорбензилоки)-этокси]-гексиламино)уксусной кислоты (**89**) растворяли в 1 мл насыщенного раствора хлороводорода в диоксане, перемешивали в течение 1 ч, упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса, остаток растворяли в 0,5 мл хлористого метилена и полученный раствор при интенсивном перемешивании добавляли к 5 мл диэтилового эфира. С отделившегося медообразного слоя декантировали растворители, остаток упаривали на РПИ в вакууме водоструйного насоса. Получали 0,04 г (32 %) гидрохлорида (6-[2-(2,6-дихлорбензилоки)этокси]гексиламино)уксусной кислоты (**90**) в виде вязкого масла. ^1H ЯМР-спектр, (D_2O , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.24-1.30 (м, 4Н, т, CH_2), 1.46 (кв, 2Н, CH_2 , $J=6.8$), 1.1.57-1.65 (кв, 2Н, CH_2 , $J=7.5$), 2.99 (т, 2Н, CH_2 , $J=7.8$), 3.40 (т, 2Н, CH_2 , $J=6.6$), 3.54-3.57 (м, 2Н, CH_2), 3.65-3.68 (м, 2Н, CH_2), 3.80 (с, 2Н, CH_2), 4.73 (с, 2Н, CH_2), 7.21 (т, 1Н, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.1$), 7.31-7.33 (д, 2Н, $\text{CH}_{\text{аром}}$, $J=8.1$). ^1H ЯМР-спектр, (CDCl_3 , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.28-1.43 (м, 6Н), 1.74 (м, 2Н), 2.53 (т, 2Н, $J=5.5$), 3.35 (т, 2Н, $J=7.2$), 3.46 (с, 2Н), 3.63-3.71 (м, 4Н), 4.68 (с, 2Н), 7.21 (д, 2Н, $J=8.3$), 7.40 (т, 1Н, $J=8.3$). ^{13}C ЯМР-спектр (D_2O , м.д.): 24.77 (CH_2), 25.28 (CH_2), 25.44 (CH_2), 28.39 (CH_2), 47.46 (CH_2), 47.50 (CH_2), 67.07 (CH_2), 69.08 (CH_2), 69.45 (CH_2), 70.75 (CH_2), 128.52 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 130.78 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 132.21 ($\text{C}^{2,6}$), 136.28 (C^1), 169.31 (COOH). ^{13}C ЯМР-спектр ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, м.д.): 25.59 (CH_2), 25.62 (CH_2), 26.21 (CH_2), 29.43 (CH_2), 47.12 (CH_2), 47.22 (CH_2), 67.33 (CH_2), 69.83 (CH_2), 70.23 (CH_2), 70.61 (CH_2), 129.11 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 131.42 ($\text{CH}_{\text{аром}}$), 135.55 ($\text{C}^{2,6}$), 136.37 (C^1) 168.56 (COOH). Масс-спектр (ESI), m/z : 378.1236 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено, m/z : 378.1235 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.2 Экспериментальная биологическая часть

Исследования проводили на белых нелинейных крысах-самцах массой 300-350 г по 5 животных в каждом эксперименте. Препараты для введения готовили путем

разведения субстанции в 3 % растворе ДМСО в воде. Препараты вводили однократно пероральным способом в двух дозах 270 и 540 мкг/кг. Пробы крови в количестве 0,1 мл отбирали с помощью системы прижизненного отбора проб DiLab через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 6; 12; 24; 36, 48; 72 и 96 ч после введения препаратов. Сбор мочи проводили через 2; 4; 6; 8; 24; 72; 96 и 120 ч после введения препаратов. До анализа пробы хранились при температуре -70°C . Концентрацию соединений **8** и **66a,б** в крови и моче лабораторных животных определяли методом хромато-масс-спектрометрии.

Подготовку проб крови осуществляли следующим способом: к 0,1 мл всех образцов, включая нулевую точку, добавляли 0,1 мл карбонатного буфера (рН=10,0-10,4) для создания щелочной среды. Экстракцию проводили 0,3 мл этилацетата дважды. Объединенные органические слои сушили в токе азота и сухие остатки перерастворяли в 0,1 мл метилового спирта. Степень извлечения из крови соединения **8** – $86 \pm 3,5 \%$, **66a** – $102 \pm 3,7 \%$, **66б** – $79 \pm 2,9 \%$.

Подготовку проб мочи осуществляли следующим способом: к 2,0 мл всех образцов, включая нулевую точку, добавляли 1,0 мл ацетатного буфера (2 М, рН=4,8-5,2) и 0,03 мл глюкуронидазы / арилсульфатазы. Полученную смесь выдерживали 1 ч при 55°C . Для извлечения бромбутерола (**8**) и его метаболитов **80a** и **85a** после проведения гидролиза добавляли концентрированную соляную кислоту для приведения рН к 4. Экстракцию веществ проводили 5,0 мл смеси диэтиловый эфир / трет-бутилметилловый эфир (9:1). Органический слой высушивали в токе азота и сухой остаток перерастворяли в 0,1 мл метилового спирта. Для извлечения 2-амино-2-этанолов **60a,б** и их метаболитов **74б**, **79б** после проведения ферментативного гидролиза добавляли 2,0 мл фосфатного буфера (рН=6,5-6,9) для приведения рН к 6. Экстракцию веществ проводили 5,0 мл смеси диэтиловый эфир / трет-бутилметилловый эфир (9:1), отбирали органический слой. К водному слою добавляли 3,0 мл этилацетата и проводили повторную экстракцию. Объединенные органические слои высушивали в токе азота и сухой остаток перерастворяли в 0,1 мл метилового спирта. Степень извлечения из мочи соединения **8** – $50 \pm 2,3 \%$, **66a** – $57 \pm 2,2 \%$, **66б** – $48 \pm 2,0 \%$, **80a** – $55 \pm 1,9 \%$, **80б** – $28 \pm 3,1 \%$, **85a** – $39 \pm 3,3 \%$, **85б** – $22 \pm 2,9 \%$.

Анализ проб проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantiva фирмы «Thermo Scientific» (США). Для хроматографического разделения использовали колонку Zorbax

Extend-C18 Narrow-Bore длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер частиц сорбента 5 мкм фирмы «Agilent» (США). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Элюирование осуществляли в обращенно-фазовом градиентном режиме: 0-1 мин – 5 % В, затем линейное увеличение к 8 мин до 95 % В, 8-10 мин – 95 % В, снижение к 10,1 мин до 5 % В, 10,1-13 мин – 5 % В. Скорость потока – 0,25 мл/мин. Температура колонки – 35 °С. Объем вводимой в хроматограф пробы – 5 мкл.

Масс-спектрометрические параметры: режим источника ионизации – положительная и отрицательная ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении; температура на распылителе – 280 °С; температура капилляра – 330 °С; газ в ячейке соударительной диссоциации – аргон. Детектирование осуществляли в режиме мониторинга селективных реакций (SRM). Параметры масс-спектрометрического детектирования соединений представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Параметры хроматографического и масс-спектрометрического детектирования определяемых соединений

Соединение	Время удерживания, мин	Тип ионизации	SRM-переходы	Энергия соударений, В	Предел обнаружения, нг/мл
8	7.55	положительная	367.0→349.0	15	0,1
			367.0→292.9*	20	
			367.0→212.0	35	
66a	6.77	положительная	263.1→204.0*	10	0,1
			263.1→169.05	25	
			263.1→133.1	25	
66b	7.44	положительная	291.1→204.0*	10	0,1
			291.1→169.05	30	
			291.1→133.1	30	
80a	8.40	отрицательная	323.8→279.9	10	1,0
			323.8→198.0*	15	
			323.8→118.0	25	
80b	7.85	отрицательная	234.0→190.0*	15	5,0
			234.0→154.0	15	
			234.0→118.0	30	

Продолжение Таблицы 15

Соединение	Время удерживания, мин	Тип ионизации	SRM-переходы	Энергия соударений, В	Предел обнаружения, нг/мл
85a	8.46	положительная	352.9→277.9*	15	0,1
			352.9→249.9	35	
			352.9→170.0	40	
85b	8.07	положительная	263.0→188.0*	20	0,1
			263.0→160.05	30	
			263.0→124.05	30	

* - SRM-переход, по которому проводилась количественная оценка

Обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения XCalibur версии 3.0. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки в диапазоне концентраций 0,1 нг/мл - 20 мкг/мл.

3.3 Экспериментальная аналитическая часть

Подготовку проб свиной и говяжьей печени осуществляли следующим образом: к навеске образца массой 5,0 г добавили 5,0 мл ацетатного буфера (0,2 М, pH=5,2) и гомогенизировали. Полученную пробу центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения 5000 об/мин при температуре 4°C. Отобрали надосадочный слой и к нему добавили 0,05 мл глюкуронидазы / арилсульфатазы. Ферментативный гидролиз с целью разрушения конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами проводили в течение ночи при температуре 37°C. Полученный гидролизованный экстракт подвергали очистке методом ТФЭ. Для этого использовали картридж с сорбентом МСХ в количестве 60 мг вместимостью 3 мл. Кондиционирование и активацию сорбента проводили последовательным пропуском 4 мл метилового спирта и 4 мл воды со скоростью 1-3 капли/с. Затем на картридж загружали экстракт пробы и пропускали со скоростью 1-3 капли/с. После пропуска образца сорбент промывали 4 мл 5 % раствора метилового спирта в воде. Элюирование целевых компонентов осуществляли дважды путем нанесения на картридж по 2 мл 1 % раствора триэтиламина в этилацетате. Элюат высушивали досуха в токе азота и перерастворили в 0,1 мл метилового спирта.

Анализ проб проводили на жидкостном хроматографе Vanquish с гибридным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q-Exactive HF-X фирмы «Thermo Scientific» (США). Для хроматографического разделения использовали колонку Hypersil Gold aQ длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер частиц сорбента 3 мкм фирмы «Thermo Scientific» (США). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 % раствор муравьиной кислоты в смеси вода / ацетонитрил (95:5, об./об.) (А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Элюирование осуществляли в обращенно-фазовом градиентном режиме: 0-2 мин – 5 % В, затем линейное увеличение к 15 мин до 95 % В, 15-18 мин – 95 % В, снижение к 18,01 мин до 5 % В, 18,01-21 мин – 5 % В. Скорость потока – 0,6 мл/мин. Температура колонки – 40 °С. Объем вводимой в хроматограф пробы – 3 мкл.

Масс-спектрометрические параметры: режим источника ионизации – положительная и отрицательная ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении; температура на распылителе – 200 °С; температура капилляра – 350 °С; газ в ячейке соударительной диссоциации – аргон.

Регистрацию содинений осуществляли в четырех последовательно переключающихся режимах работы масс-спектрометра, которые обеспечивали сбор исчерпывающей информации для идентификации целевых компонентов:

Full Scan MS Positive (Full Scan) – сканирование положительно заряженных ионов-предшественников в заданном диапазоне значений;

All Ion Fragmentation Positive (AIF) – сканирование положительно заряженных ионов-продуктов, полученных при фрагментации ионов-предшественников в высокоэффективной ячейке соударений при заданных значениях энергии диссоциации;

Full Scan MS Negative (Full Scan) – сканирование отрицательно заряженных ионов-предшественников в заданном диапазоне значений;

All Ion Fragmentation Negative (AIF) – сканирование отрицательно заряженных ионов-продуктов, полученных при фрагментации ионов-предшественников в высокоэффективной ячейке соударений при заданных значениях энергии диссоциации.

Параметры режимов работы масс-спектрометра представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Параметры работы режимов масс-спектрометра

№ режима работы	Режим работы масс-спектрометра	Параметр работы	Значение параметра
1	Full Scan MS Positive	Разрешение	15 000 отн.ед.
		Диапазон сканирования ионов-предшественников m/z	90 – 1200 Да
		Время работы режима	100 мс
		Время анализа	21 мин
		Полярность регистрации сигнала	Положительно заряженные ионы
2	AIF Positive	Разрешение	15 000 отн.ед
		Диапазон сканирования m/z ионов-продуктов	90 – 1200 Да
		Время работы режима	100 мс
		Энергия диссоциации ионов-предшественников в ячейке соударения (NCE)	20, 35, 50 эВ
		Время анализа	21 мин
		Полярность регистрации сигнала	Положительно заряженные ионы
3	Full Scan MS Negative	Разрешение	15 000 отн.ед.
		Диапазон сканирования ионов-предшественников m/z	90 – 1200 Да
		Время работы режима	100 мс
		Время анализа	21 мин
		Полярность регистрации сигнала	Отрицательно заряженные ионы
4	AIF Negative	Разрешение	15 000 отн.ед
		Диапазон сканирования m/z ионов-продуктов	90 – 1200 Да
		Время работы режима	100 мс
		Энергия диссоциации ионов-предшественников в ячейке соударения (NCE)	20, 35, 50 эВ
		Время анализа	21 мин
		Полярность регистрации сигнала	Отрицательно заряженные ионы

Параметры хромато-масс-спектрометрического детектирования и степень извлечения из печени соединений представлены в Таблице 17.

Таблица 17 – Хромато-масс-спектрометрические характеристики, предел детектирования и степень извлечения β -агонистов и их метаболитов из печени животных

Соединение	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукты, m/z	Предел детектирования, нг/г	Степень извлечения, %
2-Амино-1-арилэтанола				
5a	263.0714 [M+H] ⁺	132.0687 / 168.0452	0,19	54 ± 6
5б	277.0869 [M+H] ⁺	132.0687 / 168.0452	0,03	59 ± 4
5в	291.1028 [M+H] ⁺	132.0687 / 168.0452	0,03	70 ± 8
8	366.9839 [M+H] ⁺	211.9949 / 292.9110	0,03	65 ± 5
11	228.1153 [M+H] ⁺	118.0657 / 154.0423	0,01	77 ± 7
17	244.1103 [M+H] ⁺	134.0606 / 170.0373	0,03	38 ± 5
21a	220.1449 [M+H] ⁺	143.0608 / 116.0502	0,04	23 ± 4
21б	234.1605 [M+H] ⁺	143.0608 / 116.0502	0,05	40 ± 4
24	212.1283 [M+H] ⁺	135.0438 / 107.0499	0,05	39 ± 3
30a	212.1283 [M+H] ⁺	125.0604 / 107.0499	0,05	42 ± 5
30б	226.1442 [M+H] ⁺	125.0604 / 107.0499	0,06	32 ± 3
33	302.1754 [M+H] ⁺	121.0655 / 107.0500	0,01	97 ± 6
35	302.1754 [M+H] ⁺	137.0640 / 107.0500	0,01	102 ± 6
42	288.1598 [M+H] ⁺	121.0655 / 150.0919	0,35	28 ± 3
49	291.1704 [M+H] ⁺	231.1130 / 162.0555	0,45	22 ± 2
58	302.1754 [M+H] ⁺	107.0500 / 150.0920	0,03	79 ± 6
64	272.1284 [M+H] ⁺	143.0608 / 160.0874	0,32	31 ± 4
2-Амино-2-арилэтанола				
66a	263.0712 [M+H] ⁺	140.0266 / 169.0294	0,14	73 ± 5
66б	291.1023 [M+H] ⁺	140.0266 / 169.0294	0,15	66 ± 6
68	220.1449 [M+H] ⁺	132.0688 / 116.0501	0,04	23 ± 4
78a	311.1131 [M+H] ⁺	203.0566 / 238.0245	0,02	82 ± 3
78б	325.1292 [M+H] ⁺	203.0566 / 238.0245	0,03	69 ± 6
Метаболиты				
80a	323.8711 [M-H] ⁻	118.0289 / 199.9536	0,36	56 ± 4
80б	233.9739 [M-H] ⁻	118.0289 / 154.0059	1,54	13 ± 3

Продолжение Таблицы 17

Соединение	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукты, m/z	Предел детектирования, нг/г	Степень извлечения, %
85a	350.8823 [M-H] ⁻	224.9669 / 249.8692	0,54	37 ± 4
85b	260.9583 [M-H] ⁻	159.9720 / 174.9552	0,33	60 ± 6
90	378.1236 [M+H] ⁺	158.9770 / 112.1128	0,07	27 ± 3

Обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения XCalibur версии 3.0. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки в диапазоне концентраций от 0,1 нг/мл до 10 мкг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы синтезировали образцы β -агонистов различных подклассов простыми способами с применением доступных реагентов. Разработали способы синтеза и впервые получили метаболиты отдельных β -агонистов. Провели фармакокинетические исследования на лабораторных животных для трех β -агонистов. Полученные в ходе испытаний результаты могут быть использованы в медицинских целях для разработки форм лекарственных препаратов на основе β -агонистов, оптимизации условий использования препаратов в клинической практике. Разработали и апробировали аналитическую методику одновременного определения β -адреномиметиков и их метаболитов в субпродуктах в следовых количествах. В перспективе предложенная методика может быть использована компетентными органами для оценки безопасности мясной продукции, поступающей на российский рынок из зарубежных стран.

В дальнейшем необходимо синтезировать другие соединения группы β -агонистов и их метаболиты, что позволит расширить список определяемых веществ в сельскохозяйственной продукции и кормах для животных. Также необходимо изучение β -агонистической активности метаболитов, поскольку продукты биотрансформации могут обладать более высоким биологическим действием и выступать в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Выводы:

1. Разработаны альтернативные простые способы получения 10 β -агонистов различных подклассов: кленбутерола, кленпроперола, кленпентерола, бромбутерола, 4-гидрокситулобутерола, метапротеренола, тербуталина, рактопамина, добутамина, хигенамина, которые позволяют использовать коммерчески доступные реагенты.

2. Для получения рактопамина и добутамина вместо восьмистадийных схем синтеза, предложенных в литературе, с использованием О-бензилированных или О-метилованных исходных соединений, разработали двухстадийный способ получения *one pot*, заключающийся в восстановительном аминировании 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она октопамином или добутамином, что позволило повысить суммарный выход с 3 % до 31-33 %.

3. Восстановление кето-группы до спиртовой в 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-изопропиламиноэтаноле с использованием борогидрида натрия позволило получить изопротеренол в более мягких условиях по сравнению с предложенным в литературе каталитическим гидрированием при давлении водорода 50 атм с аналогичным выходом продукта 65 %.

4. Снятие бензильной защиты в 1-(4-бензилокси-2-хлорфенил)-2-(*трет*-бутиламино)этаноле при получении 4-гидрокситулобутерола гидрогенолизом при давлении 1 атм приводит к целевому продукту с выходом 35 %, в то время как проведение данной реакции при давлении 5 атм способствует образованию побочного продукта гидродехлорирования 2-*трет*-бутиламино-1-(4-гидроксифенил)этанола.

5. Региоселективное раскрытие оксиранов *N*-нуклеофилами в водных растворах приводит к образованию 2-амино-1-арилэтанолов, а в безводных условиях – к 2-амино-2-арилэтанолам. При получении 2-амино-2-арилэтанолов проведение реакции при комнатной температуре способствует увеличению выхода продукта с 7-20 % до 50 % по сравнению с проведением реакции в кипящем этаноле. Впервые синтезированы 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(*трет*-амиламино)этанол и 2-(4-амино-3-хлор-5-трифторметилфенил)-2-(*трет*-пентиламино)этанол.

6. Разработанные нами трехстадийные способы синтеза позволили впервые получить 4 метаболита кленбутерола и бромбутерола – 4-амино-3,5-дигалогенминадльные кислоты и 4-амино-3,5-дигалогенгиппуровые кислоты; метаболит вилантерола *N*-алкилглицин впервые синтезирован по разработанной четырехстадийной схеме.

7. Разработали хромато-масс-спектрометрический метод одновременного определения β_2 -агонистов и их метаболитов в моче, позволяющий определять соединения в концентрации от 0,1 нг/мл и выше. Провели фармакокинетические исследования для бромбутерола и 2-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2-(алкиламино)этанолов, в результате которых получили основные фармакокинетические характеристики, изучили профиль экскреции с мочой и показали, что целевые соединения и их метаболиты идентифицируются в биологических жидкостях до 120 ч.

8. Разработали и апробировали аналитическую методику, обеспечивающую одновременное хромато-масс-спектрометрическое определение следовых количеств β_2 -агонистов и их метаболитов в печени животных путем очистки образцов оптимизированным способом твердофазной экстракции на картриджах с катионообменным сорбентом после ферментативного гидролиза, позволяющую определять соединения в концентрации от 0,01 нг/г и выше.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МСВР – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА - диметилформамид

ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОМТ – катехоламин-О-метилтрансфераза

КССВ – константа спин-спинового взаимодействия

МАО – моноаминооксидаза

РПИ – роторно-пленочный испаритель

ТГФ - тетрагидрофуран

ТМС – триметилсилан

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФЭ – твердофазная экстракция

ТЭБАХ – триэтилбензиламмоний хлористый

ЦНС – центральная нервная система

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

LDA – диизопропиламид лития

SRM – мониторинг селективных реакций

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей – 14-е изд. Т. 1. – М.: Новая Волна, 2002. – 540 с.
2. Mozayani A., Raymon L. Handbook of drug interactions: a clinical and forensic guide – 2nd ed. – N.Y.: Humana Press, 2012. – 828 p.
3. Fragkaki A.G., Georgakopoulos C., Sterk S., Nielen M.W.F. Sports doping: emerging designer and therapeutic β 2-agonists // Clin. Chim. Acta. – 2013. – Vol. 425. – P. 242-258.
4. Botsoglou N.A., Fletouris D.J. Drug residues in foods. Pharmacology, food safety and analysis. – N.Y.: Marcel Dekker, 2001. – 214 p.
5. Martinez-Navarro J.F. Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver // The Lancet. – 1990. – Vol. 336. – P. 1311.
6. Pulce C., Lamaison D., Keck G., Bostvironnois C., Nicolas G., Descotes J. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver // Vet. Hum. Toxicol. – 1991. – Vol. 33. – P. 480-481.
7. Brambilla G., Cenci T., Franconi F., Galarini R., Marci A., Rondoni F., Strozzi M. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef in Italy // Toxicol. Lett. – 2000. – Vol. 114. – P. 47-53.
8. Харкевич Д.А. Фармакология – 10-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 908 С.
9. Smith D.J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock // J. Anim. Sci. – 1998. – Vol. 76. – P. 173-194.
10. Prezelj A., Obreza A., Pecar S. Abuse of clenbuterol and its detection // Curr. Med. Chem. – 2003. – Vol. 10. – P. 281-290.
11. Пат. US3536712 (США), МПК C07C 87/28, 91/22. 1-(Amino-dihalo-phenyl)-2-amino-ethanes and ethanols and salts thereof / Keck J., Kruger G., Machleidt H., Engelhardt G., Eckenfels A., Noll K. – Заявл. 22.09.1966, опубл. – 27.10.1970.
12. Пат. DE1543928 (Германия), МПК C07C, A61K. Verfahren zur herstellung von neuen amino-dihalogen-phenyl-athylaminem / Keck J., Kruger G., Machleidt H., Engelhardt G., Eckenfels A., Noll K. – Заявл. 22.09.1966, опубл. – 29.01.1970.

13. Пат. DE10248277 (Германия), МПК C07C 215/30, 213/00, C12P 7/22. Die folgendenangaben sind den vom anmelder eingereichten unterlagen entnommen / Naamnieh S., Braun M., Feaux De Lacroix V. – Заявл. 16.10.2002, – опубл. 06.05.2004.
14. Пат. WO2017/021982 (Международная заявка), МПК C07C 213/00. A process for preparing β agonist / Reddy G.P., Reddy M.K. – Заявл. 06.08.2015, – опубл. 09.02.2017.
15. Пат. CN111393311 (Китай), МПК C07C 215/68, 213/00, 213/08. Preparation of clenbuterol hydrochloride / Fan C., Lu H. – Заявл. 30.03.2020, – опубл. 10.07.2020.
16. Nery M.S., Azevedo M.S., Cardoso J.N., Slana G.B.C., Lopes R.S.C., Lopes S.S. A new chemoselective synthesis of brombuterol // Synthesis. – 2007. – № 10. – P. 1471-1474.
17. Ruff F., Zander J.F., Edoute Y., Santais M.C., Flavahan N.A., Verbeurenand T.J., Vanhoutte P.M.. Beta-2 adrenergic responses to tulobuterol in airway smooth muscle, vascular smooth muscle and adrenergic nerves. // J. Pharm. Exp. Ther. – 1988. – Vol. 244, № 1. – P. 173-180.
18. Fukuchi Y., Nagai A., Nishimura M. Clinical efficacy and safety of transdermal tulobuterol in the treatment of stable COPD: an open-label comparison with inhaled salmeterol. // Treatment in Respiratory Medicine. – 2005. – Vol. 4, № 6. – P. 447-55.
19. Koshinaka E., Kurata S., Yamagishi K., Kubo S., Kato H. Synthesis and bronchodilating activity of *o*-chloro- α -(*tert*-butylaminomethyl)-benzylalcohol hydrochloride (C-78) and related compounds // Yakugaku Zasshi. – 1978. – Vol. 98, № 9, – P. 1198-1207.
20. Song H., Lin J., Tan H., Shen L., Zhang N., Zhang Y., Tan X., Yang Y., Pan X., Zheng W. Synthesis of high purified tulobuterol and its study of the organic impurities // JCS. – 2019. – Vol. 57, № 4. – P. 229-304.
21. Пат. CN105439875 (Китай), МПК C07C 215/30, C07C 209/00. Safe synthetic method of tulobuterol with low cost / Jing Y., He S., Guo W. – Заявл. 29.01.2016, – опубл. 30.03.2016.
22. Пат. CN111170929 (Китай), МПК C07D 211/14, C07C 213/00, 215/30, 215/42. Preparation of β -amino alcohol from terminated olefins / Yan S., He S., Wu X., Jing Y. – Заявл. 12.12.2019, – опубл. 19.05.2020.

23. Пат. CN111205194 (Китай), МПК C07C 213/08, 215/30. Method for preparation of tulobuterol / Yan S., He S., Wu X., Jing Y. – Заявл. 12.12.2019, – опубл. 29.05.2020.
24. Пат. CN110590569 (Китай), МПК C07C 213/00, C07C 215/30. Method for preparation of tulobuterol / Wu J., Ye X., Li Z., Wang C. – Заявл. 08.10.2019, – опубл. 20.12.2019.
25. Пат. EP0420120 (Европейский патент), МПК C07C 215/60, A61K 31/135. Optically active benzyl alcohol compound and the use thereof / Ito Y., Kato H., Koshinaka E., Kurata S., Morikawa K. – Заявл. 25.09.1990, – опубл. 03.04.1991.
26. Matsumura K., Kubo O., Sakashita T., Kato H., Watanabe K., Hirobe M. Studies on the metabolism of tulobuterol*HCl. Identification of basic urinary metabolites in the dog, rat, rabbit, and guinea pig // Drug Metab. Dispos. – 1982. – Vol. 10, № 5. – P. 537-541.
27. Lednicher D., Mitscher L.A., Georg G.I. The organic chemistry of drug synthesis. N.Y.: Wiley-Int. – 1990. – Vol. 4. – 263 p.
28. Asato G., Baker P.K., Bass R.T., Bentley T.J., Chari S., Dalrymple R.H., France D.J., Gingher P.E., Lences B.L., Pascavage J.J., Pensack J.M., Ricks C.A. Repartitioning agents: 5-[1-hydroxy-2-(isopropylamino)ethyl]-anthranilonitrile and related phenethanolamines; agents for promoting growth, increasing muscle accretion and reducing fat deposition in meat-producing animals // Agric. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 48, № 11. – P. 2883-2888.
29. Tu Y., Zhong J., Wang H., Pan J., Xu Z., Yang W., Luo Y. Synthesis of stable isotope labeled D9-Mabuterol, D9-Bambuterol, and D9-Cimbuterol // J. Label. Compd. Radiopharm. – 2016. – Vol. 59. – P. 546-551.
30. Пат. CN109912434 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/68, 253/30, 255/59. Method for synthesizing phenylethanolamine-type β receptor agonist / Wang Y., Liu H., Chen W. – Заявл. 13.12.2017, – опубл. 21.06.2019.
31. Пат. US2308232 (США), МПК C07C17/16. Isopropylaminomethyl-(3,4-dioxyphenyl)carbinol / Scheuing G., Thoma O. – Заявл. 17.01.1939, – опубл. 12.01.1943.
32. Corrigan J.R., Langermann M., Moore M. Preparation of N-Substituted 1-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-2-aminoethanols // J. Am. Chem. Soc. – 1949. – Vol. 71. – P. 530-531.

33. Пат. CN107011187 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/60. Method for preparing isoproterenol sulfate dehydrate / Lun L., Ren X., Wang G., Wu Y. – Заявл. 17.04.2017, – опубл. 04.08.2017.
34. Пат. CN107011188 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/60. Method for preparing isoproterenol hydrochloride / Lun L., Ren X., Wang G., Wu Y. – Заявл. 17.04.2017, – опубл. 04.08.2017.
35. Пат. WO2018127806 (Международная заявка), МПК C07C 213/00, 215/60, 213/10, 215/66. Process for preparation of isoproterenol hydrochloride / Gurjar M.K., Joshi S.G., Jagtap J.T., Vadhe S.A. – Заявл. 07.01.2017, опубл. – 03.01.2018.
36. Пат. CN108863822 (Китай), МПК C07C 213/10, 213/02, 215/60. Method for refining isoprenaline hydrochloride / Zhao T., Yang S., Zhang W., Pi J., Zhang Q. – Заявл. 09.05.2017, – опубл. 23.11.2018.
37. Beccari E., Beretta A., Lawendel S. Resolution of isopropyl nor-adrenaline into optical isomers and their pharmacological potency ratio // Science. – 1953. – Vol. 118. – P. 249-250.
38. Corey E.J., Link O. The first enantioselective syntheses of pure *R*- and *S*-isoproterenol // Tetrahedron Lett. – 1990. – Vol. 31, № 5. – P. 601-604.
39. Kumar P., Kumar Upadhyay R., Kumar Pandey R. Asymmetric dihydroxylation route to (*R*)-isoprenaline, (*R*)-norfluoxetine and (*R*)-fluoxetine // Tetrahedron: Asymmetry. – 2004. – Vol. 15. – P. 3955-3959.
40. Чекман И.С. (ред.) Фармакология. – Винница: Новая книга, 2013. – 792 с.
41. Пат. BE611502 (Бельгия), МПК C07D303/22. Amino-alcools, leurs sels et procede pour leur preparation / С.Н. Boehringer Vohn. – Заявл. 15.02.1960, – опубл. 30.03.1962.
42. Пат. GB920623 (Великобритания), МПК C07D303/22. Substituted Amino-Alkohols / Boehringer E., Liebrecht I., Liebrecht J., Mayer-List W., Boehringer W.D., Boehringer G.A. – Заявл. 8.02.1961, – опубл. 13.03.1963.
43. Пат. US3937838 (США), МПК A61K 31/22. Orally active bronchospasmolytic compounds and their preparation / Wetterlin K.I.L., Svensson L.A. – Заявл. 21.06.1973, опубл. – 10.02.1976.
44. Пат. CN110734382 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/30. Method for synthesizing terbutaline / Fan C., Lu H., Yang L. – Заявл. 09.10.2019, опубл. – 31.01.2021.

45. Пат. CN109305920 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/08, 221/00, 225/06, 45/63, 49/84. Method for preparing high-purity injection-grade terbutaline sulphate / Weng X., Pang J., Long J. – Заявл. 27.07.2017, опубл. – 05.02.2019.
46. Jozwiak K., Khalid C., Tanga M.J., Berzetei-Gurske I., Jimenez L., Kozocas J.A., Woo A., Zhu W., Xiao R.-P., Abernethy D.R., Wainer I.W. Comparative molecular field analysis of the binding of the stereoisomers of fenoterol and fenoterol derivatives to the β_2 -adrenergic receptor // J. Med. Chem. – 2007. – Vol. 50. – P. 2903-2915.
47. Albrecht R., Loge O. β_2 -Agonists containing metabolically labile groups. I. The influence of ester groups in the nitrogen substituent // Eur. J. Med. Chem. – 1985. – Vol. 20, № 1. – P. 51-55.
48. Waldeck B. β -Adrenoreceptor agonists and asthma – 100 years of development // Eur. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 445. – P. 1-12.
49. Taketomi S., Asano M., Higashi T., Shoji M., Sugai T. Chemo-enzymatic route for (*R*)-terbutaline hydrochloride based on microbial asymmetric reduction of a substituted α -chloroacetophenone derivative // J. Mol. Cat. B. Enzym. – 2012. – Vol. 84, № 1. – P. 83-88.
50. Пат. CN106831452 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/30. Preparation method of terbutaline sulphate / Liu X., Luo J., Yang X., Fu H., Yi L. – Заявл. 15.02.2017, – опубл. 13.06.2017.
51. Пат. CN111454164 (Китай), МПК C07C 213/08, 215/60. Preparation of terbutaline sulphate / Wang Y., Zhang W., Zhang Y., Wang S., Liu L. – Заявл. 27.04.2020, – опубл. 28.07.2020.
52. Van Dijk J., Moed H.D. Synthesis of β -phenylethylamine derivatives X^{1*} N-(hydroxy- and methoxy-aralkyl) derivatives // Recl. Trav. Chim. Pay B. – 1973. – Vol. 92. – P. 1281-1297.
53. Пат. CN1557804 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/02. Preparation of ractopamine hydrochloride from *p*-hydroxyacetophenone and raspberry ketone / Hu H. – Заявл. 11.02.2004, – опубл. 29.12.2004.
54. Пат. CN1660775 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/00. Process for preparation of ractopamine / Bu X., Gu L., Yu Z., Huang S., Huang G. – Заявл. 30.12.2004, – опубл. 31.08.2005.

55. Пат. CN102070468 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/00. Method for synthesis of ractopamine as β -adrenergic agonist / Wang H., Li G., Liu B., Yang G., Yan J. – Заявл. 12.01.2011, – опубл. 25.05.2011.
56. Пат. CN101016249 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/34. Method for synthesizing ractopamine as β -adrenergic agonist / Yang Y., Liu B., Li W. – Заявл. 28.02.2007, – опубл. 15.08.2007.
57. Ruffolo R.R.J. The mechanism of action of dobutamine // *Ann. Intern. Med.* – 1984. – Vol. 100, № 2. – P. 313-314.
58. Ruffolo R.R.J. The pharmacology of dobutamine // *Am. J. Med. Sci.* – 1987. – Vol. 294, № 4. – P. 244-248.
59. Гиляров М.Ю. Применение добутамина в кардиологической практике // *РФК.* – 2005. – № 5. – С. 67-70.
60. Пат. DE2317710 (Германия), МПК C07C 91/32, A61K 27/00. Dopaminderivate / Tuttle R.R., Mills J. – Заявл. 12.04.1972, – опубл. 18.10.1973.
61. Tuttle R.R., Mills J. Development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility // *Circulation Research.* – 1975. – Vol. 36. – P. 185-196.
62. Пат. US5073648 (США), МПК C07C 217/54. 4-(4-Alкохуphenyl)-2-butylamine derivative and process therefor / Hagishita S., Seno K. – Заявл. 23.02.1990, – опубл. 17.12.1991.
63. Пат. WO2008/047382 (Международная заявка), МПК C07C 213/02, C07C 217/62, C07C 213/00. A process for the preparation of 4-[2-[[3-(4-hydroxyphenyl)-1-methylpropyl]amino]ethyl]-1,2-benzenediol / Pillai M.M., Mistry A.B, Patel V.M., JadaV K.J., Rao C.T., Thennati R. – Заявл. 10.07.2006, – опубл. 24.04.2008.
64. Пат. CN109851511 (Китай), МПК C07C 213/00, 215/54. Method for synthesizing dobutamine hydrochloride / Fan M., Zhou S., Qin J. – Заявл. 30.11.2017, – опубл. 07.06.2019.
65. Пат. CN115322109 (Китай), МПК C07C 215/54, 213/00, 269/06, 271/44. Green preparation of dobutamine hydrochloride suitable for industrialized production / Liu J., Xu K., Niu C., Zhao L., Zhan S. – Заявл. 26.08.2022, – опубл. 11.11.2022.
66. Kuhnert B.R., Gross T.L., Kuhnert P.M., Erhard P., Brashar W.T. Ritodrine pharmacokinetics // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 1986. – Vol. 40, № 6. – P. 656-664.

67. Brashear W.T., Kuhnert B.R., Wei R. Structural determination of the conjugated metabolites of ritodrine // *Drug Metab. Dispos.* – 1990. – Vol. 18, № 4. – P. 488-493.
68. Пат. CN107382753 (Китай), МПК C07C 213/10, C07C 215/60. Preparation method for high purity ritodrine hydrochloride / Zhenyou T. – Заявл. 24.07.2017, – опубл. 24.11.2017.
69. Пат. CN105061227 (Китай,) МПК C07C 215/60, 213/08. Environment-friendly ritodrine hydrochloride production method / Liu B., Zhang Z., Li X., Zhou S., Fu P. – Заявл. 27.07.2015, – опубл. 18.11.2015.
70. Пат. CN102060716 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/00. Process for preparation of ritodrine hydrochloride / Wei X., Li Q., Yuan F. – Заявл. 15.11.2019, – опубл. 18.05.2011.
71. Пат. CN103113239 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/04. Method for preparing ritodrine hydrochloride / Xu X. – Заявл. 11.03.2013, – опубл. 22.05.2013.
72. Пат. CN103113238 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/02. Method for preparing ritodrine / Xu X. – Заявл. 07.08.2013, – опубл. 20.11.2013.
73. Пат. CN103396326 (Китай), МПК C07C 215/60, 213/08. Method for preparing ritodrine hydrochloride / Xu X., Wang Z., Leng X., Su J., Huang D. – Заявл. 11.03.2013, – опубл. 22.05.2013.
74. Eldon M.A., Blake D.S., Coon M.J., Nordblom G.D., Sedman A.J., Colburn W.A. Clinical pharmacokinetics of procaterol: dose proportionality after administration of single oral doses // *Biopharm. Drug Dispos.* – 1992. – Vol. 13. – P. 663-669.
75. Eldon M.A., Battle M.M., Coon M.J., Nordblom G.D., Sedman A.J., Colburn W.A. Clinical pharmacokinetics and relative bioavailability of oral procaterol // *Pharm. Res.* – 1993. – Vol. 10, № 4. – P. 603-605.
76. Huang C.-H., Chu Y.-T., Kuo C.-H., Wang W.-L., Hua Y.-M., Lee M.-S., Hung C.-H. Effect of procaterol on th2-related chemokines production in human monocyte and bronchial epithelial cells // *Pediatric Pulmonology.* – 2010. – Vol. 45. – P. 977-984.
77. Yoshizaki S., Tanimura K., Tamada S., Yabuuchi Y., Nakagawa K. Sympathomimetic amines having a carbostyryl nucleus // *J. Med. Chem.* – 1976. – Vol. 19, № 9. – P. 1138-1142.

78. Пат. CN111217746 (Китай), МПК C07D 215/26. Preparation of procaterol hydrochloride impurity / Feng K., Huang S., Chen Y., Shi L., He Y. – Заявл. 10.03.2020, – опубл. 02.06.2020.
79. Fleming W.C. Synthesis of 6- and 7-hydroxy-5,8-dioxoquinolines lampterol and withafarin A / PhD Thesis (Chemistry, organic). – Arizona St. University, Arizona, 1970. – 270 P.
80. Пат. WO2005/061499 (Международная заявка), МПК C07D 471/10, C07D 221/20, C07D 209/54, A61K 31/438, A61K 31/403, A61K 31/407, A61P 11/06, A61P 11/08, A61P 19/02, A61P 29/00. Novel tricyclic spiroderivatives as modulators of chemokine receptor activity / Hossain N., Ivanova S. – Заявл. 22.12.2003, – опубл. 07.07.2005.
81. Пат. JP200831067 (Япония), МПК C07D 215/60, C07B 61/00. Method for preparing carbostyryl derivative / Koichi N. – Заявл. 27.07.2006, – опубл. 14.02.2008.
82. Pu L.-X., Xiao R., Zhang Y.-W., Song H. Process improvement on the synthesis of 5-(2-bromobutylacyl)-8-hydroxy quinolone // Chin. J. Synth. Chem. – 2013. – Vol. 21, № 6. – P. 739-742.
83. Jhong H.-M., Liu Y.-H., Peng S.-M., Liu S.-T. Oxidative cleavage of styrenes catalyzed by a Pd^{II} complex of an 8-hydroxyquinolinonate ligand // Eur. J. Inorg. Chem. – 2016. – Vol. 35. – P. 5449-5455.
84. Effendi N., Ogawa K., Mishiro K., Takarada T., Yamada D., Kitamura Y., Shiba K., Maeda T., Odani A. Synthesis and evaluation of radioiodinated 1-{2-[5-(2-methoxyethoxy)-1H-benzo[d]imidazole-1-yl]quinolin-8-yl}piperidin-4-amine derivatives for platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) imaging // Bioorg. Med. Chem. – 2017. – Vol. 25. – P. 5576-5585.
85. Yoshizaki S., Osaki M., Nakagawa K., Tamura Y. Synthesis of 8-hydroxycarbostyryl // Chem. Pharm. Bull. – 1980. – Vol. 28, № 11. – P. 3441-3443.
86. Sigouin O., Beauchamp A.L. Oxo-rhenium(V) complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives // Can. J. Chem. – 2005. – Vol. 83. – P. 460-470.
87. Пат. CN107629000 (Китай), МПК C07D 215/26. Preparation method of indacaterol intermediate 5-chloroacetyl-8-benzyloxy-2(1H)-quinolinone / Wang K., Hu Z. – Заявл. 19.09.2017, – опубл. 26.01.2018.
88. Пат. CN107602462 (Китай), МПК C07D 215/22. Method for preparing hydroxyl-2(1H)-quinoline / Lu D., Wang X., Xiao H. – Заявл. 10.10.2017, – опубл. 19.01.2018.

89. Пат. BE823841 (Бельгия), МПК C07D 215/26, C07D 215/32, A61K 31/47, A61P 11/08, A61P 25/02. Derives de 5-(1-hydroxy-2-amino substitue)alkyl-8-carbostyryle substitue et de 5-(1-hydroxy-2-amino substitute)alkyl-8-(3,4-dihydro)carbostyryle substitute et leur ptocede de preparation / Nakagawa K., Yoshizaki S., Tanimura K., Tamada S. – Заявл. 24.12.1974, – опубл. 16.04.1975.
90. Пат. ES519011 (Испания), МПК C07D 215/22, A61K 31/47. Procedimiento para la obtencion de un compuesto derivado del carbostirilo / Andreoli Rovati R., Lioveras Parera P., Cirera Dotti X. – Заявл. 14.01.1983, – опубл. 16.04.1984.
91. Пат. ES519384 (Испания), МПК C07D 215/22, A61K 31/47. Procedimiento para la obtencion de un compuesto derivado de la 2-quinolinona / Andreoli Rovati R., Lioveras Parera P., Cirera Dotti X. – Заявл. 28.01.1983, – опубл. 16.03.1984.
92. Пат. JP51136678 (Япония), МПК C07D 215/26, C07D 401/06, C07D 413/06, A61K 31/47, A61K 31/535, A61P 9/08, A61P 9/12. Process for preparing 5-[(2-alkylamino-1-hydroxy)alkyl]carbostyryl derivatives / Nakagawa K., Yoshizaki S., Tanimura K., Tamada S. – Заявл. 19.05.1975, – опубл. 26.11.1976.
93. Пат. ES549575 (Испания), МПК C07D 215/22, A61K 31/47. Un procedimiento para la preparacion de quinolonas sustituidas / Arin Abad M.J., Cossent Aguinaco I., Fernandes Martin J.A. – Заявл. 14.12.1985, – опубл. 16.03.1986.
94. Пат. JP51141880 (Япония), МПК C07D 215/26, A61K 31/47. Process for preparing carbostyryl derivatives / Nakagawa K., Yoshizaki S., Tanimura K., Tamada S. – Заявл. 28.05.1975, – опубл. 07.12.1976.
95. Пат. JP51143678 (Япония), МПК C07D 215/26, A61K 31/47. A process for preparing carbostyryl derivatives / Nakagawa K., Yoshizaki S., Tanimura K., Tamada S. – Заявл. 05.06.1975, – опубл. 10.12.1976.
96. Ogata E.S. Isoxsuprine infusion in the rat: alterations in maternal, fetal and neonatal glucose homeostasis // J. Perinat. Med. – 1981. – Vol. 9. – P. 293-301.
97. Erkert R.S., Macallister C.G. Isoxsuprine hydrochloride in the horse: a review // J. Vet. Pharmacol. Therap. – Vol. 25. – P. 81-87.
98. Moed H.D., Van Dijk J. Synthesis of β -phenyl-ethylamine derivatives. IV. A new vasodilator // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. – 1956. – Vol. 75. – P. 1215-1220.

99. Van Dijk J., Moed H.D. Synthesis of β -phenylethylamine derivatives VI. Stereoisomers of 1-(4'-hydroxyphenyl)-2-(1''-methyl-2''-phenoxyethylamino)propanol-1 // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* – 1959. – Vol. 78. – P. 22-42.
100. Viswanathan C.L., Kodgule M.M., Chaudhari A.S. Design, synthesis and evaluation of racemic 1-(4-hydroxyphenyl)-2-[3-(substituted phenoxy)-2-hydroxy-1-propyl]amino-1-propanol hydrochlorides as novel uterine relaxants // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2005. – Vol. 15. – P. 3532-3535.
101. Liang Z., Xu C., Dong L., Fu Y., Wu Q., Zhao J., Ye L., Cai Z., Liu M., Xia B., Tang L., Liu Z. Involvement of UDP-glucuronosyltransferases in higenamine glucuronidation and the gender and species differences in liver // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – Vol. 93. – P. 172-179.
102. Yun-Choi H.S., Pyo M.K., Park K.M., Chang K.C., Lee D.H. Anti-thrombotic effects of higenamine // *Planta Med.* – 2001. – Vol. 67, № 7. – P. 619-622.
103. Feng S., Jiang J., Hu P., Zhang J., Liu T., Zhao Q., Li B. A phase I study of pharmacokinetics and pharmacodynamics of higenamine in healthy Chinese subjects // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2012. – Vol. 33. – P. 1353-1358.
104. Yan-Choi H.S., Kim M.H. Higenamine reduced mortalities in the mouse models of thrombosis and endotoxic shock // *Yakhak Hoeji.* – 1994. – Vol. 38, № 2. – P. 191-196.
105. Morales M.A., Bustamante S.E., Brito G., Paz D., Cassels B.K. Metabolites norarmepavine, coclaurine and norcoclaurine // *Phytother. Res.* – 1998. – Vol. 12. – P. 103-109.
106. Lee S.-R., Schriefer J.H.M., Gunnels T.A., Harvey I.C., Bloomer R.J. Acute oral intake of a higenamine-based dietary supplement increases circulating free fatty acids and energy expenditure in humans subjects // *Lipids in Health and Disease.* – 2013. – Vol. 12. – P. 148-155.
107. Pyo M.K., Lee D.-H., Kim D.-H., Lee J.-H., Moon J.-C., Chang K.C., Yan-Choi H.S. Enantioselective synthesis of (R)-(+)- and (S)-(-)-higenamine and their analogues with effects on platelet aggregation and experimental animal model of disseminated intravascular coagulation // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18. – P. 4110-4114.

108. Pesnot T., Gershater M.C., Ward J.M., Hailes H.C. Phosphate mediated biomimetic synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids // *Chem. Commun.* – 2011. – Vol. 47. – P. 3242-3244.
109. Maresh J.J., Crowe S.O., Ralko A.A., Aparece M.D., Murphy C.M., Krzeszowiec M., Mullooney M.W. Facile one-pot synthesis of tetrahydroisoquinolines from amino acids via hypochlorite-mediated decarboxylation and Pictet-Spengler condensation // *Tetrahedron Lett.* – 2014. – Vol. 55. – P. 5047-5051.
110. Bonamore A., Rovardi I., Gasparrini F., Baiocco P., Barba M., Molinaro C., Botta B., Boffi A., Macone A. An enzymatic, stereoselective synthesis of (*S*)-norcoclaurine // *Green Chem.* – 2010. – Vol. 12. – P. 1623-1627.
111. Пат. CN103351338 (Китай), МПК C07D 217/20. Simple method for preparation of higenamine hydrochloride / Zhao J., Zhang M., Peng X., Wang L. – Заявл. 17.06.2013, – опубл. 16.10.2013.
112. Пат. CN115260094 (Китай), МПК C07D 217/20. Preparation of higenamine hydrochloride / Cai Q., Tang W., Qi W., Luo L., Jiang H. – Заявл. 16.06.2022, – опубл. 01.11.2022.
113. Пат. EP1439164 (Европейский патент), МПК C07C 215/28, C07C 213/04, A61P 11/06, A61P 11/00, A61P 29/00. Novel phenylethanolamine compounds having beta2-acceptor excitatory function and their preparation method / Cheng M., Pan L., Li L., Zhang L., Shen J., Song G., Li Z. – Заявл. 30.09.2001, – опубл. 21.07.2004.
114. Ge X., Mo Y., Xing G., Ji L., Zhao H., Chen J., He B., Chen X., Xing R., Li X., Zhao Y., Li J., Yan H., Woo A. Y.-H., Zhang Y., Lin B., Pan L., Cheng M. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 2-amino-2-phenylethanol derivatives as novel β_2 -adrenoceptor agonists // *Bioorg. Chem.* – 2018. – Vol. 79. – P. 155-162.
115. Krueger G., Keck J., Noll K., Pieper H. Synthesis of further amino-halogen-substituted phenyl aminoethanols // *Arzneim. Forsch.* – 1984. – Vol. 34. – P. 1612-1624.
116. Gonzalez-Antuna A., Lavandera I., Rodriguez-Gonzalez P., Rodriguez J., Alonso J.I.G., Gotor V. A straightforward route to obtain $^{13}\text{C}_1$ -labeled clenbuterol // *Tetrahedron.* – 2011. – Vol. 67. – P. 5577-5581.
117. Schmid J., Prox A., Zimmer A., Keck J., Kaschke S. Biotransformation of clenbuterol // *Fresenius's J. Anal. Chem.* – 1990. – Vol. 337. – P. 121.

118. Zalko D., Debrauwer L., Bories G., Tulliez J. Metabolism of clenbuterol in rats // *Drug Metab. Dispos.* – 1998. – Vol. 26, № 9. – P. 891-899.
119. Montesissa C., Anfossi P., Biancotto G., Angeletti R. In vitro metabolism of clenbuterol and bromobuterol by pig liver microsomes // *Xenobiotica.* – 1998. – Vol. 28, № 11. – P. 1049-1060.
120. Bres J., Clauzel A.M., Pistre M.C., Rachmat H., Bressole F. Metabolisme des substances beta-adrenergiques. Implications therapeutiques // *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* – 1985. – Vol. 21. – P. 19-34.
121. Шульженко Л.В., Болотова Е.В. Эффективность и безопасность агонистов β 2-адренорецепторов ультрадлительного действия // *Пульмонология.* – 2015. – Т. 25, № 1. – С. 113-118.
122. Чикина С.Ю. Комбинация вилантерол / флутиказона фууроат (Релвар Эллипта®) при бронхиальной астме: обзор клинических исследований // *Пульмонология.* – 2015. – Т. 25, № 5. – С. 622-627.
123. Hanania N.A., Feldman G., Zachgo W., Shim J.-J., Crim C., Sanford L., Lettis S., Barnhart F., Haumann B. The efficacy and safety of the novel long-acting β 2 agonist vilanterol in patients with COPD // *Chest.* – 2012. – Vol. 142, № 1. – P. 119-127.
124. Cazzola M., Calzetta L., Matera M.G. B_2 -adrenoceptor agonists: current and future direction // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 163. – P. 4-17.
125. Harrell A.W., Siederer S.K., Bal J., Patel N.H., Young G.C., Felgate C.C., Pearce S.J., Roberts A.D., Beaumont C., Emmons A.J., Pereira A.I., Kempford R.D. Metabolism and disposition of vilanterol, a long-acting β 2-adrenoceptor agonist for inhalation use in humans // *Drug Metab. Dispos.* – 2013. – Vol. 41, № 1. – P. 89-100.
126. Ellipta B. Extract from the clinical evaluation report for Fluticasone furoate / Vilanterol trifenate // *Therapeutic Good Administration, Australian Public Assessment Report.* – 2014. – P. 2-197.
127. Li T., Cao J., Li Z., Wang X., He P. Broad screening and identification of β -agonists in feed and animal body fluid and tissues using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry combined with spectra library search // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 192. – P. 188-196.
128. Wang X.-J., Zhang F., Ding F., Li W.-Q., Chen Q.-Y., Chu X.-G., Xu C.-B. Simultaneous determination of 12 β -agonists in feeds by ultra-high-performance liquid

- chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1278. – P. 82– 88.
129. León N., Roca M., Igualada C., Martins C.P.B., Pastor A., Yusá V. Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1258. – P. 55– 65.
130. Wang X., Guo T., Wang S., Yuan J., Zhao R. Simultaneous Determination of 11 β -Agonists in human urine using high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry with isotope dilution // *J. Anal. Toxicol.* – 2014. – P. 1-6.
131. Thevis M., Opfermann G., Schanzer W. Liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for β -agonists in human or equine urine // *J. Mass Spectrom.* – 2003. – V. 38. – P. 1197-1206.
132. Mauro D., Ciardullo S., Civitareale C., Fiori M., Pastorelli A.A., Stacchini P., Palleschi G. Development and validation of a multi-residue method for determination of 18 β -agonists in bovine urine by UPLC–MS/MS // *Microchem. J.* – 2014. – V. 115. – P. 70-77.
133. Moragues F., Igualada C. How to decrease ion suppression in a multiresidue determination of β -agonists in animal liver and urine by liquid chromatography–mass spectrometry with ion-trap detector // *Anal. Chim. Acta.* – 2009. – V. 637. – P. 193– 195.
134. Nielen M.W.F., Lasaroms J.J.P., Essers M.L., Oosterink J.E., Meijer T., Sanders M.B., Zuidema T., Stolker A.A.M. Multiresidue analysis of beta-agonists in bovine and porcine urine, feed and hair using liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – V. 391. – P. 199–210.
135. Shao B., Jia X., Zhang J., Meng J., Wu Y., Duan H., Tu X. Multi-residual analysis of 16 β -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Food Chem.* – 2009. – V. 114. – P. 1115– 1121.
136. Blanca J., Munoz P., Morgado M., Mendez N., Aranda A., Reuvers T., Hooghuis H. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 529. – P. 199–205.

137. Williams L.D., Churchwell M.I., Doerge D.R. Multiresidue confirmation of β -agonists in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS // *J. Chromatogr. B.* – 2014. – V. 813. – P. 35-45.
138. Kootstra P.R., Kuijpers C.J.P.F., Wubs K.L., Doorn van D., Sterk S.S., Ginkel van L.A., Stephany R.W. The analysis of beta-agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 529. – P. 75–81.
139. Sniegocki T., Sell B., Posyniak A. Analysis of β -agonists in different biological matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Vet. Res.* – 2021. – P. 469-475.
140. Guy P.A., Savoy M.-C., Stadler R.H. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* – 1999. – V. 736. – P. 209-219.
141. Wasch K., Brabander H., Courtheyn D. LC-MS-MS to detect and identify four beta-agonists and quantify clenbuterol in liver // *Analyst.* – 1998. – V. 123. – P. 2701-2705.
142. Juan C., Igualada C., Moragues F., Leon N., Manes J. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass-spectrometry method for the analysis of β -agonists in animal feed and drinking water // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 6061-6068.
143. Dominguez-Romero J.C., Garcia-Reyes J.F., Martinez-Romero R., Martinez-Lara E., Moral-Leal M.L.D., Molina-Diaz A. Detection of main urinary metabolites of β 2-agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* – 2013. – V. 923-924. – P. 128-135.
144. Xu F., Zhang Z., Tian Y., Jiao H., Liang J., Gong G. High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry determination of tulobuterol in rabbit's plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 37. – P. 187-193.
145. Girault J., Fourtillan J.B. Determination of clenbuterol in bovine plasma and tissues by gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry // *J. Chromatogr.* – 1990. – V. 518. – P. 41-52.
146. Poletini A. Bioanalysis of β 2-agonists by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques // *J. Chromatogr. B.* – 1996. – V. 687. – P. 72-42.

147. Damasceno L., Ventura R., Ortuno J., Segura J. Derivatization procedures for the detection of β 2-agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis // *J. Mass Spectrom.* – 2000. – V. 35. – P. 1285-1294.
148. Corcia D.D., Morra V., Pazzi M., Vincenti M. Simultaneous determination of β 2-agonists in human urine by fast-gas chromatography/mass spectrometry: method validation and clinical application // *Biomed. Chromatogr.* – 2010. – V. 24. – P. 358-366.
149. Degroot J.-M., Bukanski B.W., Groof J.D., Beernaert H. Cimaterol and clenbuterol residue analysis by HPLC-HPTLC in liver // *Z Lebensm Unters Forsch.* – 1991. – V. 192. – P. 430-432.
150. Hu Y., Liu R., Li Y., Li G. Investigation of ractopamine-imprinted polymer for dispersive solid-phase extraction of trace β -agonists in pig tissues // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – P. 2017-2025.
151. Hahnau S., Julicher B. Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other beta 2-agonists // *Food Addit. Contam.* – 1996. – V. 13, № 3. – P. 259-274.
152. Haasnoot W., Stouten P., Schilt R., Hooijernik D. A fast immunoassay for the screening of β -agonist in hair // *Analyst.* – 1998. – V. 123. – P. 2707-2710.
153. Harkins J., Woods W., Lehner A., Fisher M., Tobin T. Clenbuterol in the horse: urinary concentrations determined by ELISA and GC/MS after clinical doses // *JVPT.* – 2001. – V. 24, № 1. – P. 7-14.
154. Pinheiro I., Jesuino B., Barbosa J., Ramos F., Matos J., Silveira M. Production of “in house” reference materials for ELISA screening of bovine urine and liver samples for clenbuterol // *Accred. Qual. Assur.* – 2008. – V. 13, № 6. – P. 299-304.
155. Traynor I., Crooks S., Bowers J., Elliott C. Detection of multi-beta-agonist residues in liver matrix by use of a surface plasma resonance biosensor // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – V. 483, № 1-2. – P. 187-191.
156. He P., Wang Z., Zhang L., Yang W. Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol // *Food Chem.* – 2009. – V. 123, № 3. – P. 707-714.
157. Franzen V., Driesen H.-E. Umsetzung von sulfonium-yliden mit polaren doppelbindungen // *Chem. Ber.* – 1963. – J. 96, № 7. – S. 1881-1890.

158. Попков С.В., Коваленко Л.В., Тащи В.П., Богельфер Л.Я. Синтез винилзамещенных оксиранов и их превращение в дигидрофураны // Изв. АН. Сер. хим. – 1994. – № 8. – С. 1439-1444.
159. Hodgson H.H., Jenkinson T.A. The Reimer-Tiemann reaction with m-chlorophenol // J. Chem. Soc. – 1927. – № 1. – P. 1740-1742.
160. Пат. EP2401263 (Европейский патент), МПК C07D 249/10, C07D 277/02, A61K 31/554, A61P 25/28. Substituted azole derivatives, pharmaceutical composition containing the derivatives, and method for treating parkinson's disease using the same / Park C.-H., Min H.-K., Lim M.-J., Lee J.-W., Chung J.-Y., Ryu C.-H., Yoon Y.-J., Ji M.-K., Park J.-Y. – Заявл. 25.02.2009, – опубл. 04.01.2012.
161. Venkateswarlu K., Suneel K., Das B., Reddy K.N., Reddy T.S. Simple catalyst-free regio- and chemoselective monobromination of aromatics using NBS in polyethylene glycol // Synth. Commun. – 2009. – Vol. 39. – P. 215-219.
162. Masilamani D., Rogic M.M. Sulfuryl chloride as a reagent for selective chlorination of symmetrical ketones and phenols // J. Org. Chem. – 1981. – Vol. 46. – P. 4486-4489.
163. Пат. CN105037207 (Китай), МПК C06C 269/06. (Iso-)leucinamide carbamate derivative and application / Zhao W., Zhang C., Gao Y., Yang H., Hou Y., Yu S. – Заявл. 18.06.2015, – опубл. 17.05.2017.
164. Li J.Q., Wang Z.P., Gao Y., Zhao W.G. Design, synthesis and effect of the introduction of a propargyloxy group on the fungicidal activities of 1-substituted phenoxypropan-2-amino valinamide carbamate derivatives // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6. – P. 82131-82137.
165. Regla I., Reyes A., Korber C., Demare P., Estrada O., Juaristi E. Novel applications of Raney nickel / isopropanol: efficient system for the reduction of organic compounds // Synth. Commun. – 1997. Vol. 27, № 5. – P. 817-823.
166. Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G., Tatchell A.R. Vogel's Textbook of practical organic chemistry – 5th ed. N.Y.: Longman Scientific&Technical. – 1989. – P. 729-730.
167. Казанский Б.А. (ред.). Синтезы органических препаратов. Сборник 1. – М.: Иностранная литература, 1949. – С. 270-273.

168. Merz A. Phasentransfer-katalysierte reaktionen IV: eine einfache Mandelsäure-synthese // *Synthesis*. – 1974. – № 10. – P. 724-725.
169. Compere E.L. Synthesis of α -hydroxyarylacetic acids from bromoform, arylaldehydes, and potassium hydroxide, with lithium chloride catalyst // *J. Org. Chem.* – 1968. – Vol. 33, № 6. – P. 2565-2566.
170. Яновская Л.Я., Юфит С.С. Органический синтез в двухфазных системах. – М.: Химия, 1982. – С. 126.
171. Moersch G.W., Zwiesler M.L. The synthesis of α -hydroxycarboxylic acids by aeration of lithiated carboxylic acids in tetrahydrofuran solution // *Synthesis*. – 1971. – № 12. – P. 647-468.
172. Казанский Б.А. (ред.). Синтезы органических препаратов. Сборник 3. – М.: Иностранная литература, 1952. – С. 322-325.
173. Синтезы органических препаратов. Сборник 7. – М.: Иностранная литература, 1956. – С. 15-18.
174. Гринштейн Дж., Вениц М. Химия аминокислот и пептидов. – М.: Мир, 1965. – С. 464-475.
175. Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. – М.: Химия, 1968. – С. 431-438.
176. Sonntag N.O.V. The reactions of aliphatic acid chlorides // *Chem. Rev.* – 1953. – Vol. 52, № 2. – P. 237-399.
177. Stern R., Reffet D., Hirschauer A., Commereuc D., Chauvin Y. New synthesis of N-acyliminodiacetic acid by condensation of amides with formaldehyde in the presence of carbon monoxide catalyzed by dicobalt octacarbonyl // *Synth. Commun.* – 1982. – Vol. 12, № 14. – P. 1111-1113.
178. Taschner E. Neue Veresterungsmethoden in der Peptidchemie. VIII Darstellung von tert-butylestern freier aminosäuren // *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. – 1961. – Vol. 646. – P. 134-136.
179. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика. – М.: Медицина, 1980. – С. 8-97.
180. Zhang Y., Zhang Z., Sun Y., Wei Y. Development of an analytical method for the determination of β 2-agonist residues in animal tissues by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated $[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]^{5-}$ -luminol

- chemiluminescence detection // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55. – P. 4949-4956.
181. Prasad V.K., Ricci R.A., Nunning B.C., Granatek A.P. Improved, rapid spectrophotofluorometric method for assay of isoproterenol hydrochloride injections: a comparative study // *J. Pharm. Sci.* – 1973. – Vol. 62, № 7. – P. 1135-1140.
182. Effenberger F., Jager J. Synthesis of the adrenergic bronchodilators (R)-terbutaline and (R)-salbutamol from (R)-cyanohydrins // *J. Org. Chem.* – 1997. – Vol. 62. – P. 3867-3873.
183. Матвеева З.М., Кочетов А.И., Сергеева З.И., Зеленкин К.Н., Иоффе Б.В. Получение непредельных азосоединений и их превращение в азины // *ЖОрХ.* – 1969. – Т. 5, № 3. – С. 424-427.
184. Hurd C., Perletz P. Aryloxyacetones // *J. Am. Chem. Soc.* – 1946. – Vol. 68, № 1. – P. 38-40.
185. Whitney W.B., Henze H.R. Synthesis of compounds with hypnotic properties. II. Phenoxyethylhydantoins. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1938. – Vol. 60, № 5. – P. 1148–1151.
186. Пат. CN110256410 (Китай), МПК C07D 403/14. Heteroaryl estrogenic agents and application thereof / Song M.X., Suxia Y.D. – Заявл. 31.05.2019, – опубл. 19.09.2020.
187. Kimachi T., Kawase M., Matsuki S., Tanaka K., Yoneda F. First total synthesis of coenzyme factor 420 // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* – 1990. – P. 253-256.