



УДК 577.112.4 : 542.955 : 547.435.2 : 547.254.9'238

**МЕРКУРИРОВАННЫЕ О-ЗАМЕЩЕННЫЕ ГИДРОКСИЛАМИНЫ
В КАЧЕСТВЕ РТУТЬСОДЕРЖАЩЕГО КАРБОНИЛЬНОГО
РЕАГЕНТА***Хомутов А. Р., Хурс Е. Н.* , Хомутов Р. М.*.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Неизвестные ранее ртутьсодержащие О-замещенные гидроксилламины синтезированы присоединением ацетата ртути к О-аллилгидроксиламину в среде гидроксильных растворителей и меркурированием N-замещенного м-толуидина. Соответствующие меркаптиты образуют окислы с пиридоксаль-5'-фосфатом и аспаратаминотрансферазой. Обсуждаются перспективы использования синтезированных соединений как нового типа ртутьсодержащих карбонильных реагентов.

Ртутьорганические соединения как ароматического, так и алифатического ряда используются в биохимической практике благодаря способности селективно реагировать с сульфгидрильными группами белков, на чем основано применение их в количественном и функциональном анализе, а также для введения электроноплотных меток в рентгеноструктурных и электронномикроскопических исследованиях [1].

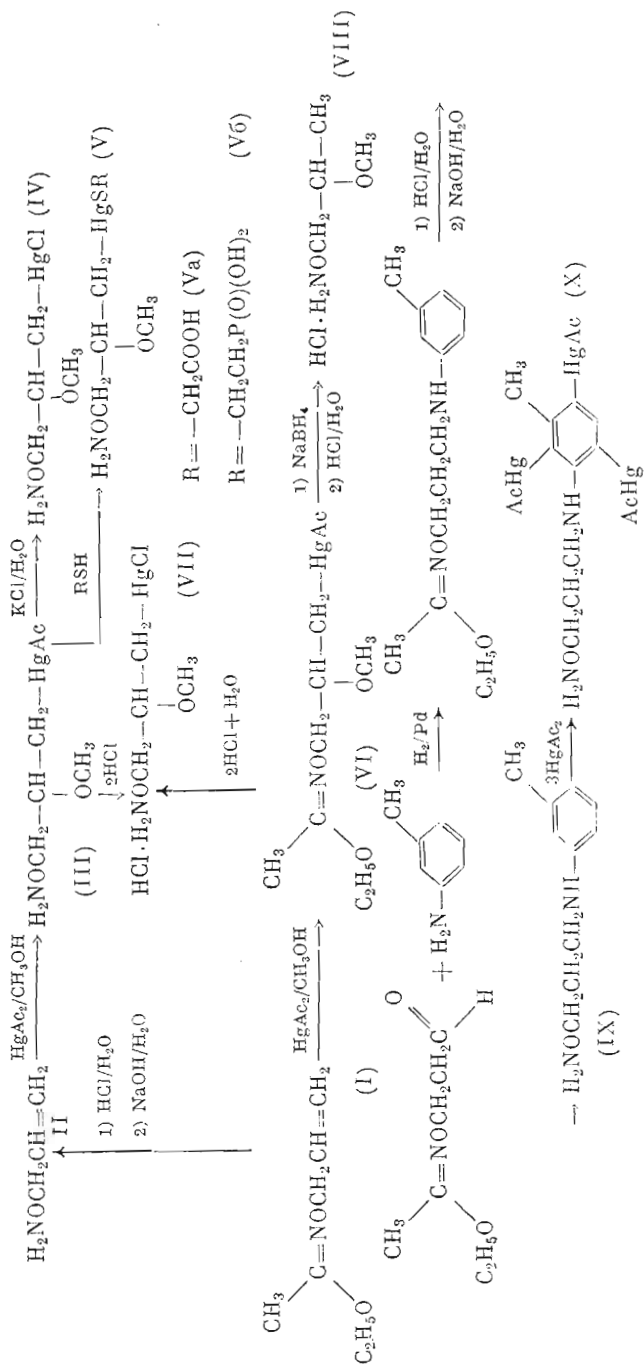
Для получения ртутных производных по другим функциональным группам биополимеров необходимы соответствующим образом активированные ртутьсодержащие реагенты, из которых доступными являются лишь ацилирующие соединения. Так, меркурированные ароматические сульфонильфториды нашли применение для получения тяжелоатомных производных сериновых протенназ по гидроксильной группе активного центра [2, 3] и для ацилирования аминоксил-тРНК, что лежит в основе одного из методов выделения индивидуальных тРНК [4]. Введение подобным способом ртутьсодержащих меток в полилизин позволило наблюдать его в электронном микроскопе.

В последние годы удалось осуществить прямое меркурирование пуклевых кислот [5—8] и белков [9] без затрагивания функциональных групп биополимеров. Хотя эти исследования значительно расширяют возможности использования ртутьорганических соединений в биохимических исследованиях, неспецифичность реакции меркурирования накладывает определенные ограничения на возможности метода.

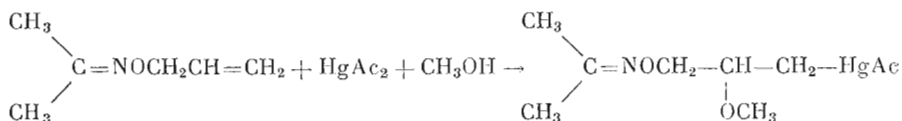
В настоящей работе описано получение нового вида тяжелоатомных реагентов — меркурированных О-замещенных гидроксилламинов, которые могут оказаться полезными для избирательной модификации карбонильной и активированной карбоксильной групп, а также взаимодействия их с пиридоксаль-5'-фосфатом и аспаратаминотрансферазой.

Для гидроксилламина известны алкильные производные как по кислороду, так и по азоту, однако последние (как и сам гидроксилламин) восстанавливают соли ртути и ртутьорганические соединения [10]. Поэтому для получения производных со связью углерод—ртуть могли быть пригодны лишь более стабильные О-замещенные гидроксилламины.

Одним из самых мягких способов введения ртути в органические соединения является реакция присоединения солей ртути по кратным углерод-углеродным связям с участием молекулы растворителя (обычно воды и спиртов, но также карбоновых кислот и аминов) [11] аналогично представленным на схеме превращениям (I) в (VI) и (II) в (III). Поэтому казалось целесообразным использовать этот метод для получения первых представителей меркурированных гидроксилламинов (схема).



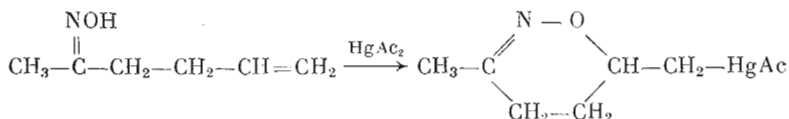
Возможность реакции присоединения была сначала проверена на *N*-защитенных производных *O*-аллилгидроксиламина — *N*-изопропилидено-вом производном:



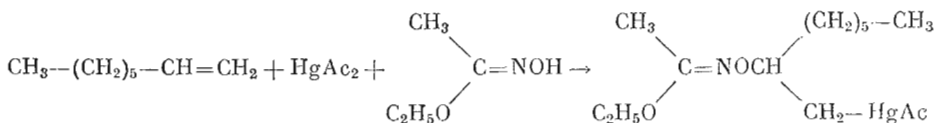
и *N*-этилиденэтоксипроизводном (превращение (I) в (VI) на схеме). В метаноле реакция с эквивалентным количеством ацетата ртути заканчивалась быстро и приводила с количественным выходом к продуктам присоединения.

Далее было выяснено, что *O*-алкилгидроксиламина со свободной аминоксигруппой вполне устойчивы к солям ртути, образуя лишь плохо растворимые в метаноле комплексы, которые нормально реагируют с кратными связями подобно свободным солям ртути, легко разлагаются разбавленными щелочами до исходного *O*-алкилгидроксиламина и окиси ртути, медленно образуют оксимы. *O*-Аллилгидроксиламин в водном или спиртовом растворах гладко реагирует с ацетатом ртути с образованием меркурированного гидроксиламина со свободной H_2NO -группой (превращение (II) в (III) на схеме).

Интересным подходом для одновременного введения аминоксигруппы и атома ртути могла быть реакция присоединения в среде производного гидроксиламина. Принципиальная возможность протекания такой реакции следовала из циклизации 5-оксииминогексена-1 в процессе присоединения солей ртути [12]:



Действительно, октен-1 давал нормальный продукт присоединения: с ацетатом ртути в среде этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты:



Однако попытки снятия защиты аминоксигруппы действием эквивалентных количеств HCl и воды [13] приводили к разрыву связи углерод—ртуть.

По своим свойствам меркурированные гидроксиламина оказались аналогичны обычным продуктам присоединения. Обменом аниона были получены удобные для выделения хлорид (IV) и бромид. Среди меркаптидов хорошей растворимостью выделялись соответствующие производные тиогликолевой (Va) и β -меркаптоэтилфосфоновой (Vб) кислот. Избыток соляной кислоты разлагал продукты присоединения до сулемы и неопределенного гидроксиламина, в щелочных условиях меркурированные гидроксиламина были устойчивы. В случае продукта присоединения (VI) удалось действием 2 экв. HCl и 1 экв. воды снять защиту аминоксигруппы, получить малоустойчивый хлоргидрат хлорида (VII). Восстановление (VI) натрийборгидридом при нагревании в водном спирте [14] приводило после удаления защиты аминоксигруппы к хлоргидрату (VIII), что являлось доказательством строения продукта присоединения.

Замещение водорода на ртуть — важнейший метод синтеза ртутьорганических соединений ароматического ряда. Устойчивость H_2NO -группы к солям ртути позволила использовать реакцию меркурирования для получения ароматических *O*-замещенных гидроксиламинов, что было показано на примере синтеза соединения (X), проходящего без осложнений в стандартных условиях получения полимеркурированных *m*-толуидинов [15].

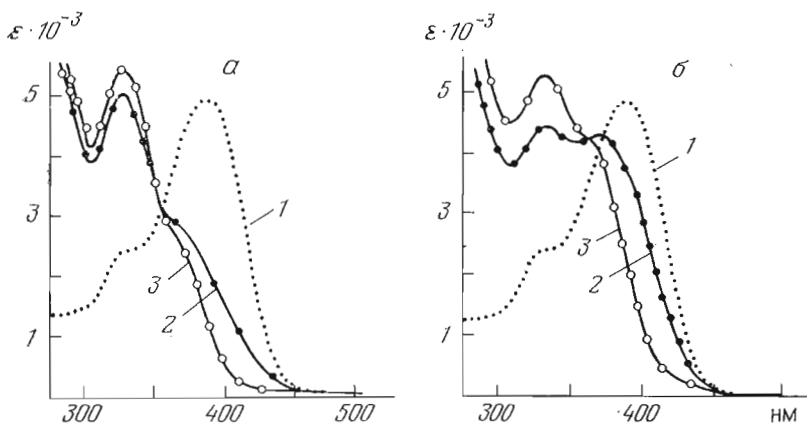


Рис. 1. Абсорбционные спектры пиридоксаль-5'-фосфата (1) и его оксимов с О-метилгидроксиламином (а) и соединением (Vб) непосредственно после смешения (2) и через 15 мин (3). Условия проведения реакций см. «Экспер. часть»

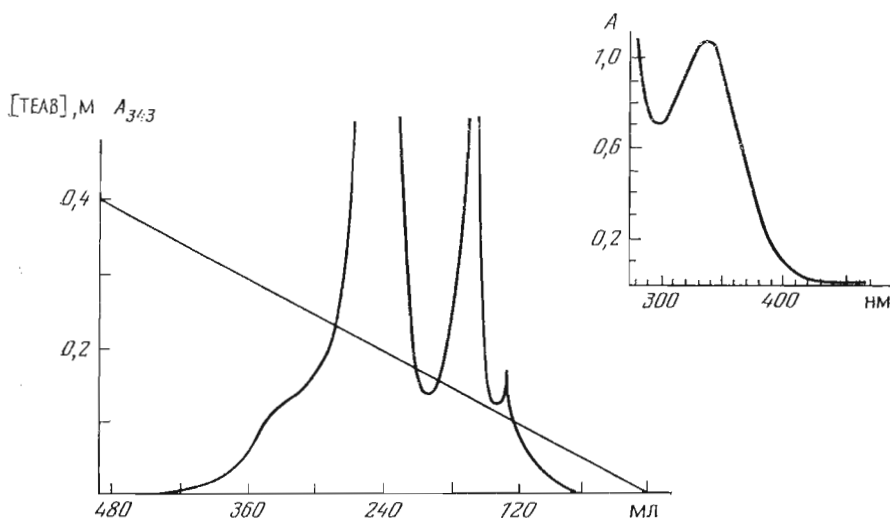


Рис. 2. Выделение оксима пиридоксаль-5'-фосфата с соединением (Vб) ионообменной хроматографией на целлюлозе DE-32 в градиенте концентрации ТЕАВ. Условия выделения и синтеза оксима описаны в «Экспер. части»

Возможность использования меркурированных гидроксилминов для избирательной модификации карбонильной или активированной карбоксильной группы белков подразумевала исключение неспецифических реакций по сульфгидрильным группам биополимеров. Ранее было показано на примере меркурированных пиридиновых нуклеозидтрифосфатов и РНК-полимеразы или ДНК-полимеразы I, что для сохранения субстратных свойств достаточно превращения меркурированного трифосфата в соответствующий меркапид [7], тогда как соединения с незащищенной ртутной функцией инактивируют фермент благодаря взаимодействию с сульфгидрильными группами белка.

Аналогично для реакций с карбонильными соединениями использовались специально синтезированные высокорстворимые меркапиды меркурированных гидроксилминов (Va) и (Vб). Взаимодействие их с пиридоксаль-5'-фосфатом приводило без затрагивания С—Hg- или S—Hg-связей к меркурированным оксимам (рис. 1). Пиридоксалиденовое производное (Vб) было выделено хроматографией на DEAE-целлюлозе (рис. 2). Известно, что О-алкилгидроксилмины реагируют с аспаратаминотрансферазой и образуют оксимы фермента с характерным УФ-спектром. Аналогично протекала реакция аспаратаминотрансферазы с ртутьсодер-

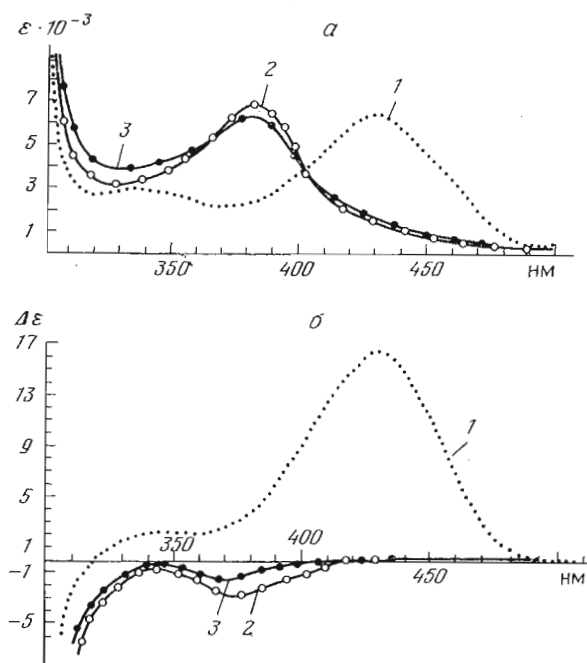


Рис. 3. Абсорбционные (а) и КД-спектры (б) аспаратаминотрансферазы (1) и ее оксимов с О-метилгидроксиламином (2) и соединением (Va) (3). Условия проведения реакций см. «Экспер. часть»

жащим гидроксиламином (Va). Изменения УФ- и КД-спектров свидетельствовали об образовании оксима фермента (рис. 3).

Неожиданной оказалась пассивность соединения (III) в реакциях с альдегидами и кетонами: многочасовая инкубация с ацетоном или пиридоксаль-5'-фосфатом при pH 5,0 не приводила к образованию соответствующих оксимов, возможно, из-за существования (III) в виде циклического внутреннего комплекса. В пользу такого предположения свидетельствует нормальный характер взаимодействия пиридоксаль-5'-фосфата с соединениями (Va), (Vб) и (X), в которых возможность комплексообразования подавлена образованием меркаптидов или жестко фиксированным расположением ацетоксимеркур- и аминоксигрупп в ароматическом производном.

В заключение кажется целесообразным указать на возможность применения растворимых ацетатов ртутиорганических О-замещенных гидроксиламинов, например, (III) и (X), в качестве ртутиорганических SH-реагентов, что позволило бы мягким способом вводить в белки обычно в них не присутствующие аминоксигруппы. Преимуществом такой модификации, до сих пор не описанной для белков, является ее обратимость.

Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на приборе Beckman 25 (Beckman, США), КД-спектры — на дихрографе Jobin Yvon (Jobin Yvon, Франция), спектры $^1\text{H-NMR}$ снимали в D_2O (внутренний стандарт — *трет*-бутанол) и в CDCl_3 на спектрометре XL-100-15 (Varian, США) с рабочей частотой 100 МГц. Элементный анализ на ртуть выполняли как в работе [16]. Гомогенную аспаратаминотрансферазу из сердца свиньи получали согласно [17].

1-Этоксиптилиденаминооксипропен-2 (I). К раствору 11,5 г (0,5 моль) натрия в 120 мл метанола добавляли 51,5 г (0,5 моль) этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты [18], затем при 5—10° С медленно добавляли 66,5 г (0,5 моль) бромистого аллила, перемешивали при этой температуре до нейтрального pH. Реакционную смесь выливали в воду, экстрагировали CHCl_3 , сушили MgSO_4 и перегоняли. Сырой продукт (I) промывали 0,1 М раствором NaOH в воде, сушили MgSO_4 и после перегонки получили 55,3 г (выход 77%) соединения (I), т. кип. 68° С (40 мм рт. ст.), n_D^{18} 1,4298. Найдено, %: С 58,59; Н 9,28. $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$. Вычислено, %: С 58,72; Н 9,15.

1-Аминооксипропен-2-(О-аллилгидроксиламин) (II). К 10,5 г (0,0735 моль) соединения (I) в 100 мл изопропанола прибавляли 10 мл конц. соляной кислоты, через

10—15 мин упаривали досуха и остаток кристаллизовали из изопропанола с эфиром. Получали 7,2 г (выход 90%) хлоргидрата (II), т. пл. 173—174° С ([19]: 173—173,5° С). К 7,2 г (0,066 моль) хлоргидрата (II) в смеси 10 мл воды и 10 мл эфира, охлажденной до 0° С, медленно прибавляли 7,0 мл 10 М раствора NaOH в воде. Эфирный слой отделяли, водный экстрагировали 4 × 10 мл эфира. Объединенные эфирные вытяжки сушили над КОН и перегоняли. После двух перегонки получали 3,31 г (выход 69%) (II), т. кип. 97,5—98° С, n_D^{25} 1,4332 ([19] т. кип. 97,5—99° С, n_D^{25} 1,4342).

1-Аминоокси-2-метокси-3-хлормеркурипропан (IV). К 0,59 г (0,008 моль) (II) в 16 мл метанола прибавляли небольшими порциями 2,55 г (0,008 моль) HgAc₂, перемешивали до отрицательной пробы на ион ртути (~15—20 мин) и прибавляли 0,57 г (0,008 моль) KCl в 16 мл воды. Осадок отделяли, промывали водой, метанолом, эфиром и получали 2,45 г (выход 89%) соединения (IV), т. пл. 128—130° С (с разл.). Найдено, %: Hg 59,23. C₄H₁₀ClHgNO₂. Вычислено, %: Hg 58,97.

Тиогликолилмеркаптинид 1-аминоокси-2-метокси-3-меркурипропана (Va) и β-меркаптоэтилфосфинилмеркаптинид 1-аминоокси-2-метокси-3-меркурипропана (Vб). К раствору 0,005 моль уксуснокислого 1-аминоокси-2-метокси-3-ацетоксимеркурипропана (III) в 10 мл метанола, приготовленного как описано выше, прибавляли при перемешивании 0,005 моль титрованного по [20] раствора тиогликолевой (синтез (Va)) или β-меркаптоэтилфосфиновой кислоты* (синтез (Vб)) в метаноле, выпавший осадок отделяли, промывали метанолом и после высушивания в вакууме над P₂O₅/KOH получали 1,35 г (выход 92%) продукта (Va), разлагающегося без плавления выше 132° С, и 1,85 г (выход 83%) соединения (Vб), разлагающегося без плавления выше 149° С.

Хлоргидрат 1-аминоокси-2-метоксипропана (VII). К 7,15 г (0,05 моль) (II) в 60 мл метанола прибавляли небольшими порциями 15,9 г (0,05 моль) HgAc₂, перемешивали при комнатной температуре до отрицательной реакции на ион ртути и упаривали наповину. Полученный раствор уксуснокислого 1-аминоокси-2-метокси-3-ацетоксимеркурипропана в течение 1 ч прибавляли при перемешивании к кипящему раствору 8,0 г (0,21 моль) NaBH₄ в 50 мл 4 М раствора NaOH в 50% спирте, кипятили еще 4 ч, разбавляли вдвое 4 М NaOH в воде и экстрагировали эфиром. Эфирные вытяжки промывали водой, сушили MgSO₄ и после второй перегонки получали 2,4 г (выход 28%) 1-этоксипропан-2-ола, т. кип. 92° С (30 мм рт. ст.), n_D^{20} 1,4217.

К 2,4 г (0,013 моль) 1-этоксипропан-2-ола в 15 мл изопропанола прибавляли 1,5 мл конц. соляной кислоты, через 10—15 мин упаривали досуха, остаток кристаллизовали из спирта с этилацетатом и получали 1,4 г (выход 72%) соединения (VII), т. пл. 76—78° С. Найдено, %: С 33,87; Н 8,58. C₁₁H₁₂ClNO₂. Вычислено, %: С 33,93; Н 8,54. ¹H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 1,25 (д, 3H, CH₃), 3,44 (с, 3H, OCH₂), 3,85 (м, 1H, CH), 4,10 (д, 2H, CH₂).

Диэтилоксид N-(3-аминооксипропил)-м-толуидина (IX). Смешивали 6,25 г (0,063 моль) м-толуидина с 10,5 г (0,063 моль) β-этоксипропилового альдегида [22], через 10—15 мин прибавляли 30 мл метанола и гидрировали над Pd-чернью при атмосферном давлении. Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, объединенные фильтраты сушили MgSO₄ и перегоняли. После второй перегонки получали 4,75 г (выход 32%) N-(3-этоксипропилокси)-м-толуидина, т. кип. 125—127° С (0,12 мм рт. ст.), n_D^{20} 1,5309. ¹H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 1,27 (т, 3H, CH₃CH₂), 1,91 (с, 3H, CH₃), 2,24 (с, 3H, CH₂C₆H₄), 3,16 (т, 2H, CH₂NH), 3,96 (т, 2H, CH₂ON), 3,98 (кв, 2H, CH₂CH₃), 6,25—6,88 (4H, аром. протоны).

К 4,5 г (0,018 моль) N-(3-этоксипропилокси)-м-толуидина в 15 мл *n*-бутанола прибавляли 4 мл конц. соляной кислоты, через 10—15 мин упаривали досуха, остаток кристаллизовали из абс. бутанола и получали 2,5 г (выход 54%) продукта (IX), т. пл. 174—176° С (со вспениванием). Найдено, %: С 47,49; Н 7,16. C₁₀H₁₄Cl₂N₂O. Вычислено, %: С 47,44; Н 7,17. ¹H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 2,20 (м, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,43 (с, 3H, CH₃), 3,60 (т, 2H, CH₂NH), 4,23 (т, 3H, CH₂ONH₂), 7,22—7,50 (4H, аром. протоны).

2,4,6-Триацетоксимеркур-N-(3-аминооксипропил)-м-толуидин (X). К раствору 0,96 г (0,003 моль) HgAc₂ в 10 мл метанола добавляли раствор основания (IX) (получен из 0,253 г (0,001 моль) соединения (IX)) в метаноле и перемешивали при комнатной температуре до отрицательной реакции на ион ртути. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом, эфиром и получали 0,83 г (выход 87%) лимонно-желтых кристаллов соединения (X). Аминооксигруппы в продукте (X) количественно определяли и титрованием с пиридоксаль-5'-фосфатом, согласно [23]. Соединение (X) аналогично этиловому эфиру 2,4,6-триацетоксимеркур-N-(3-аминооксипропил)-м-толуидоуксусной кислоты [15] хорошо растворимо в ледяной уксусной кислоте и нерастворимо в большинстве органических растворителей.

Аналогично описанному получен ²⁰³Hg-соединение (X) с уд. акт. 1,8 мкКл/ммоль.

Взимодействие пиридоксаль-5'-фосфата с O-метилгидроксиламином и соединением (Va). К 2,0 мл 1,86 · 10⁻⁴ М пиридоксаль-5'-фосфата в 0,1 N-ацетатном буфере, pH 5,0, добавляли 0,01 мл 0,1 М раствора хлоргидрата O-метилгидроксилamina в воде или 0,02 мл 5 · 10⁻² М раствора соединения (Va) в 1,0 М растворе NaHCO₃. Спектры поглощения образовавшихся оксимов пиридоксаль-5'-фосфата с O-метилгидроксиламином и соединением (Va) соответственно представлены на рис. 1.

* β-Меркаптоэтилфосфиновая кислота получена кислотным гидролизом соответствующего диэтилового эфира [21] в виде весьма гигроскопичного вещества. Динциклогексиламмонийная соль имеет т. пл. 214—216° С (этанол — этилацетат).

Оксим пиридоксаль-5'-фосфата с (Vб). 45 мг (0,1 ммоль) продукта (Vб) и 40 мг (0,15 ммоль) моногидрата пиридоксаль-5'-фосфата в 20 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, пикубировали 2 ч в темноте при комнатной температуре, наносили на колонку (объем 25 мл) ДЕАЕ-целлюлозы (DE-32, Whatman, Англия) в HCO_3^- -форме, промывали водой, а затем элюировали градиентом вода — 0,4 М триэтиламмоний-бикарбонатный буфер, рН 7,5 (по 250 мл). Профиль разделения и спектр оксима пиридоксаль-5'-фосфата с производным (Vб) приведены на рис. 2.

Взаимодействие O-метилгидроксиламина и (Va) с аспаратаминоотрансферазой. К 0,5 мл раствора фермента, содержащего 2,1 мг белка в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 5,0, прибавляли 0,46 мл воды, 0,025 мл 2,5 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0), 0,01 мл $5,0 \cdot 10^{-2}$ М раствора (Va) в 1,0 М растворе NaHCO_3 или 0,005 мл 0,1 М раствора хлоргидрата O-метилгидроксиламина в воде и после перемешивания снимали спектры поглощения и КД-спектры (рис. 3 а и б соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бландел Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. М.: Мир, 1979. С. 228—231.
2. Sigler P. B., Jeffery B. A., Matthews B. W., Blow D. M. // J. Mol. Biol. 1966. V. 15. № 1. P. 175—192.
3. Surbeck E., Wilcox P. E. // Fed. Proc. 1964. V. 23. Abstr. 686.
4. Goss D. J., Parkhurst L. J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 21. P. 7804—7806.
5. Dale R. M. K., Livingston D. C., Ward D. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. № 81. P. 2238—2242.
6. Dale R. M. K., Martin E., Livingston D. C., Ward D. C. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 11. P. 2447—2457.
7. Dale R. M. K., Ward D. C. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 11. P. 2458—2469.
8. Dale R. M. K., Ward D. C., Livingston D. C., Martin E. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. № 6. P. 915—930.
9. Korn A. P., Ottensmeyer F. P., Jack T. R. // J. Inorg. Biochem. 1979. V. 10. № 3. P. 235—255.
10. Макарова Л. Г., Несмеянов А. Н. Методы элементоорганической химии. Ртууть. М.: Наука, 1965. С. 248.
11. Макарова Л. Г., Несмеянов А. Н. Методы элементоорганической химии. Ртууть. М.: Наука, 1965. С. 115.
12. Макарова Л. Г., Несмеянов А. Н. Методы элементоорганической химии. Ртууть. М.: Наука, 1965. С. 152.
13. Хомутов Р. М. // Журн. общ. химии. 1961. Т. 31. С. 1992—1995.
14. Henbest H. B., Nickolls B. // J. Chem. Soc. 1959. № 1. P. 227—236.
15. Schrauth W., Schoeller W. // Chem. Ber. 1912. B. 45. S. 2808—2818.
16. Макарова Л. Г., Несмеянов А. Н. Методы элементоорганической химии. Ртууть. М.: Наука, 1965. С. 394.
17. Banks B. E. C., Doonan S., Lawrence A. J., Vernon C. A. // Eur. J. Biochem. 1968. V. 5. № 4. P. 528—539.
18. Хомутов Р. М., Северин Е. С., Гнучев Н. В., Деревянко Т. Я. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1967. № 8. С. 1820—1823.
19. Несмеянов А. Н., Кочетков А. К., Фрейдлина Р. Х. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1951. № 5. С. 512—517.
20. Ellman G. H. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70—77.
21. Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl). Stuttgart: G. Thieme Verlag, 1963. B.XII/1. S. 508.
22. Карпейский М. Я., Хомутов Р. М., Северин Е. С. // Журн. общ. химии. 1962. Т. 32. С. 1357—1358.
23. Korpela T. K., Mäkelä M. J. // Anal. Biochem. 1981. V. 110. № 2. P. 251—258.

Поступила в редакцию
23.VI.1987

MERCURATED O-SUBSTITUTED HYDROXYLAMINES, A NEW MERCURY-CONTAINING CARBONYL REAGENTS

KHOMUTOV A. R., KHURS E. N.*, KHOMUTOV R. M.*

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry;
* Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Earlier unknown mercury-containing O-substituted hydroxylamines have been synthesised either through addition of mercury diacetate to O-allylhydroxylamine or by direct mercuriation of N-substituted *m*-toluidine. The corresponding mercaptides react smoothly with pyridoxal-5'-phosphate and aspartate aminotransferase. Some aspects of application of the above compounds as novel mercury-containing carbonyl reagents and for introducing NH_2O -groups through reactive thiol residues of proteins are discussed.