



УДК 547.963.057:577.113.6

## РЕАГЕНТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ.

### VI\*. ЗАМЕЩЕННЫЕ ОКСИМЫ И ГИДРАЗОН

### *n*-АЗИДОТЕТРАФТОРБЕНЗАЛЬДЕГИДА. СИНТЕЗ, СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, ПРЯМОЙ И СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЙ ФОТОЛИЗ

© 1996 г. М. И. Добриков<sup>#</sup>, Р. Ю. Дудко, Г. В. ШишкинНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.03.95 г. После доработки 10.10.95 г.

Осуществлен синтез новых гетеробифункциональных реагентов – О-[(сукцинимидо-*N*-окси)карбонилметил]-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (I), гидрохлорида О-(4-аминобутил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (II), гидрохлорида *N*-(3-аминопропионил)-*n*-азидотетрафторбензальгидразона (III) и О-(*N*-*n*-бутилкарбамоилметил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (IV). Исследован фотолиз полученных реагентов в этаноле при разных длинах волн и в пиридине. По спектральным характеристикам и фотоактивности соединения (I)–(III) представляют собой перспективные гетеробифункциональные реагенты для введения фотоактивных групп в биополимеры. Исследована синглет-синглетная сенсibilизация фотолиза гидразона (III) 9-аминоакридином и показана возможность создания на его основе фотореагентов, чувствительных к видимому свету.

*Ключевые слова:* перфторароматические азиды, сенсibilизация, фотолиз, фотомодификация нуклеиновых кислот.

Для изучения комплементарно-адресованной фотомодификации ДНК ранее были синтезированы гетеробифункциональные реагенты на основе производных *n*-азидобензойной, 2-нитро-5-азидобензойной и *n*-азидотетрафторбензойной кислот [2], которые при фотолизе образуют продукты реакций преимущественно кетенимина [3, 4], триплетного [5, 6] и синглетного нитренюв [7, 8] соответственно.

В работах [9–12] была исследована комплементарно-адресованная фотомодификация ДНК этими фотореагентами, присоединенными к олигонуклеотидам-адресам, и было показано, что тип модификации, ее эффективность и селективность по отношению к разным нуклеотидам ДНК-мишени зависят от заместителей в бензольном кольце арилазидной группы.

Наиболее перспективными фотореагентами оказались олигонуклеотиды, несущие *n*-азидотетрафторбензамидные группы, для которых эффективность достигает 70–80% при наличии гуанозина в точке предполагаемой фотомодифика-

ции ДНК-мишени. Существенным недостатком этих производных является то, что введение в *n*-азидобензоильный остаток четырех атомов фтора вызывает гипсохромный сдвиг максимума поглощения с 271 до 251 нм [9]\*, т.е. к тому диапазону длин волн, где поглощают белки и нуклеиновые кислоты, что создает технические сложности для описания и характеристики полученных на их основе конъюгатов. И хотя фотоактивность перфторированных арилазидов настолько велика, что, как правило, их фотолиз успевает закончиться раньше, чем начнут повреждаться биополимеры [13], совпадение спектров биополимера-мишени и фотореагента приводит к поглощению основной части подводимого света биополимером, что делает эти реагенты мало пригодными для изучения сложных биологических систем (белково-нуклеиновые комплексы, органеллы клеток и т.д.).

В связи с этим возникла необходимость получить новые гетеробифункциональные реагенты на основе перфторированных ароматических азидов, поглощающие в более длинноволновой части спектра и обладающие более высокой фотоактивностью.

Сокращения: HOSu – *N*-гидрокси-сукцинимид, S – синглетный нитрен, YS – ирид синглетного нитрена с пиридином, Prg – пиридин.

\* Сообщение V см. [1].

<sup>#</sup> Автор для переписки.

\* В статье [9] по вине авторов допущена ошибка: в табл. 4 вместо  $N_3Ar_1NHR$  следует читать  $RNH(CH_2)_3CH_3$ .

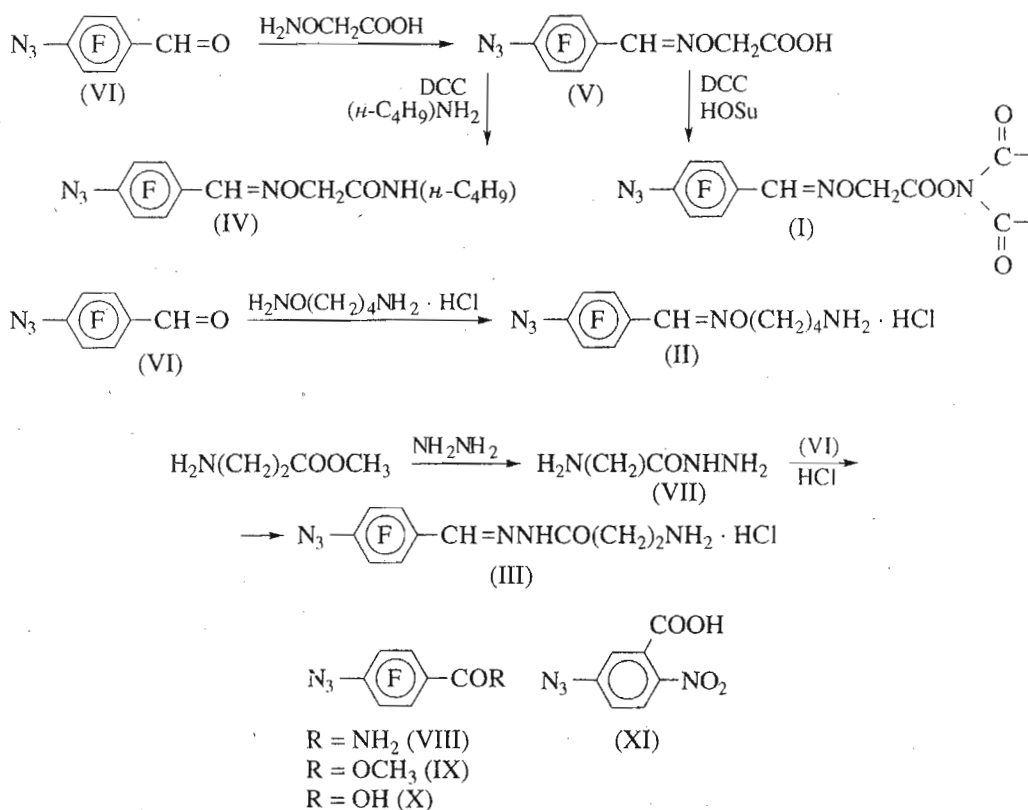


Схема 1.

В данной работе описан синтез трех новых гетеробифункциональных реагентов: O-[(сукцинимидо-N-окси)карбонилметил]-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (I), гидрохлорида O-(4-аминобутил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (II), гидрохлорида N-(3-аминопропионил)-*n*-азидотетрафторбензальгидразона (III), пригодных для присоединения к олигонуклеотидам по концевому фосфату (реагенты (II), (III)) и по заранее введенной по концевому фосфату или в гетероциклическое основание аминогруппе (реагент (I)). Кроме того, описан O-(*N*-*n*-бутилкарбамоилметил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксим (IV), который моделирует продукт присоединения фотореагента (I) к биополимерам.

Методы синтеза азидов (I)–(IV) представлены на схеме 1. Фотореагент (I) был получен при обработке O-(карбоксиметил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (V) DCC и *N*-гидроксисукцинимидом, а модельное соединение (IV) – обработкой того же исходного (V) *n*-бутиламином в присутствии DCC. Промежуточное соединение (V) выделено в результате конденсации O-карбоксиметилгидроксиламина с *n*-азидотетрафторбензальдегидом (VI). Конденсация хлоргидрата O-(4-аминобутил)гидроксиламина с азидом (VI) привела к фотореагенту (II). Обработкой метилового эфира β-аланина гидразингидратом был получен гидразид (VII), при конденсации которого с азидом (VI) был синтези-

рован фотореагент (III). Строение всех синтезированных соединений доказано элементарным анализом, <sup>1</sup>H-ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопией.

Для вновь синтезированных соединений (I)–(V) облучением при разных длинах волн была изучена спектральная светочувствительность в этаноле. В качестве параметра относительной фотоактивности этих соединений использовано время полуфотоллиза ( $\tau_{1/2}$ ), т.е. время, за которое концентрация исходного азиды уменьшается в 2 раза. В таблице результаты сопоставлены с данными для амида *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (VIII), полученного как описано в работе [13], и для исходного *n*-азидотетрафторбензальдегида, который, как показано в [14], является высокоэффективным реагентом для фотоиммобилизации ферментов. Такое сопоставление подтверждает, что синтезированным реагентам (I), (II), (IV), (V) и особенно соединению (III) свойственны достаточно большие батохромные сдвиги (на 32–34 и 51 нм соответственно) максимумов полос поглощения относительно амида (VIII). Еще большие сдвиги наблюдаются относительно исходного азиды (VI), вероятно, потому, что последний в этаноле находится в форме полуацетала. Кроме того, следует отметить значительный гиперхромный (в 1.5–2 раза) эффект для всех производных азиды (VI). Наблюдаемые спектральные различия обуславливают

Спектральные характеристики и время полуфотолитиза ( $\tau_{1/2}$ ) перфторированных ароматических азидов в этаноле

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\tau_{1/2}$ (с) при облучении светом с интервалом длин волн, нм			
			254–400	303–365	303–313	334–365
(I), (IV)	287	26000	6	45	120	3600
(II), (V)	289	31000	5	23	150	2000
(III)	306	35500	6	15	80	420
(VI)*	251	15000	6	30	500	8000
(VIII)	255	18000	30	150	5400	9000

\* Вероятнее всего, находится в виде полуацетала.

существенное увеличение фотоактивности полученных азидов по сравнению с амидом (VIII), особенно при облучении УФ-светом с длиной волны 303–313 нм:  $\tau_{1/2}$  для оксимов (II) и (V) в 36 раз, для оксимов (I) и (IV) в 45 раз, а для гидразона (III) в 67 раз меньше, чем для соединения (VIII); в среднем оксимо- и гидразонопроизводные (I)–(V) в 3–6 раз более фотоактивны, чем альдегид (VI) (таблица).

Таким образом, по своим спектральным характеристикам и фотоактивности соединения (I)–(III) представляют собой перспективные гетеробифункциональные реагенты для проведения комплементарно-адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот.

Известно, что основной процесс, протекающий при фотолитизе пентафторфенилазида [15], 2,6-дифторфенилазида [16] и метилового эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (IX) [8, 16] в пиридине, приводит к образованию илида YS из синглетного нитрена-S (схема 2). Стабильный аддукт YS легко и избирательно регистрируется благодаря характерному поглощению в районе 400 нм.

Мы считаем, что фотолитиз в пиридине с образованием илида YS можно рассматривать как упрощенную модель электрофильной реакции фотомодификации нуклеиновых кислот внутри комплементарного комплекса, так как наиболее нуклеофильные центры в нуклеиновых кислотах – атомы азота гетероциклических оснований пиридинового типа (N7 и N3 в dG; N1, N3 и N7 в dA; N3 в dC), а низкая молекулярная масса и высокая растворимость пиридина позволяют создавать концентрации нуклеофила, близкие к локальным концентрациям реакционных центров внутри комплементарного комплекса. В связи с этим была исследована кинетика фотолитиза в пиридине полученных и некоторых описанных в литературе перфторароматических азидов.

На рис. 1 представлена кинетика накопления илидов YS при облучении светом с длиной волны 303–313 нм перфторароматических азидов (II)–(VI), а также известных *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (X) и ее метилового эфира (IX) [13] в пи-

ридине. Время окончания темновой реакции образования YS оценивали по выходу изменений оптической плотности при 400 нм на плато при сохранении изобестических точек. При этом полагали, что 100% исходного азида в этих условиях превращается в соответствующий илид YS. Правомерность такого допущения вытекает из сопоставления кинетических параметров фотолитиза азида (IX) с приведенными в литературе [16], из близости коэффициентов экстинкции в максимумах поглощения в районе 400 нм всех образующихся илидов YS, а также из данных тонкослойной хроматографии реакционных смесей.

Из рис. 1 видно, что реакция перфторарилазидов (II)–(VI) практически заканчивается в течение 15 мин, в то время как нарастание концентрации YS для азида (IX) продолжается более 2 ч, т.е. описанные в данной работе азиды в использованных условиях существенно более фотоактивны, чем известный азид (IX). Скорость образования илидов сильно зависит от заместителя в пара-положении к азидогруппе. Введение более электроноакцепторной  $-\text{COOCH}_3$ -группы в азиде (IX) (кривая 2) вместо  $-\text{COO}^-$  в азиде (X) (кривая 1) в 2 раза увеличивает скорость образования соответствующего илида. Если карбоксильная группа не сопряжена с азидогруппой, как в азиде (IV) и (V) (кривые 5 и 4), то наблюдается та же зависимость, но эффект заместителя значительно меньше. Увеличение цепи сопряжения в оксимах (II), (IV) и (V) (кривые 6, 4, 5 соответственно) и гидразоне (III) (кривая 3) по сравнению с соединением (IX) вызывает еще более резкое увеличение скорости образования таких илидов: в 7 раз для азидов (III) и (VI), в 8 раз для кислоты (V), в 12 раз для амина (II) и в 15 раз для амида (IV). Следует отметить,

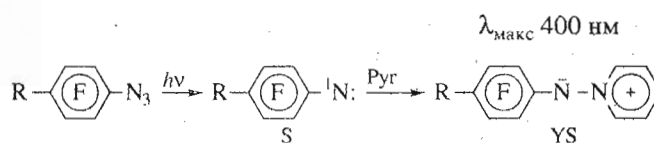


Схема 2.

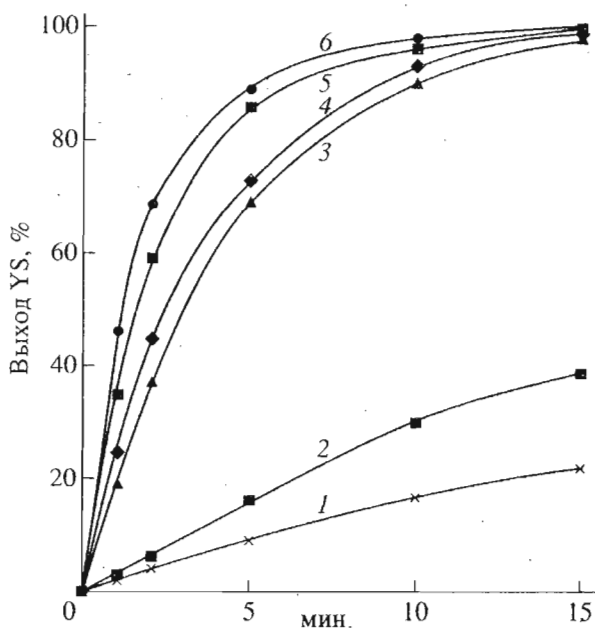


Рис. 1. Кинетика накопления илидов YS при облучении в пиридине перфторароматических азидов УФ-светом с интервалом длин волн 303–313 нм: 1 – (X), 2 – (IX), 3 – (III), (VI), 4 – (V), 5 – (IV), 6 – (II).

что скорость накопления илида, образующегося из гидразона (III) (кривая 3) и обладающего самым длинноволновым спектром поглощения и наибольшей фотоактивностью в этаноле, находится на уровне таковой для исходного альдегида (VI) и значительно уступает скорости накопления илидов, возникающих из оксимов (II), (IV) и (V).

По данным пиридин-илидного метода, все вновь синтезированные азиды по кинетическим параметрам фотолитиза значительно превосходят *n*-азидотетрафторбензойную кислоту (X) и ее метиловый эфир (IX) и поэтому могут быть перспективными фотореагентами для модификации нуклеиновых кислот. Однако, учитывая кинетические характеристики фотореакций этих азидов с пиридином, можно заключить, что для эффективной комплементарно-адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот более предпочтительны олигонуклеотидные производные оксимов (II) и (V).

Для возможного смещения спектральной светочувствительности перфторированных ароматических азидов в видимую область мы рассмотрели сенсibilизацию фотолитиза азидов красителями. В литературе [15] описана триплет-триплетная сенсibilизация пентафторфенилазида 4-бензоилбифенилом. Такая сенсibilизация несколько расширяет область спектральной светочувствительности, но малопригодна для модификации нуклеиновых кислот, так как генерируемые при этом триплетные нитрены обладают сравнительно низ-

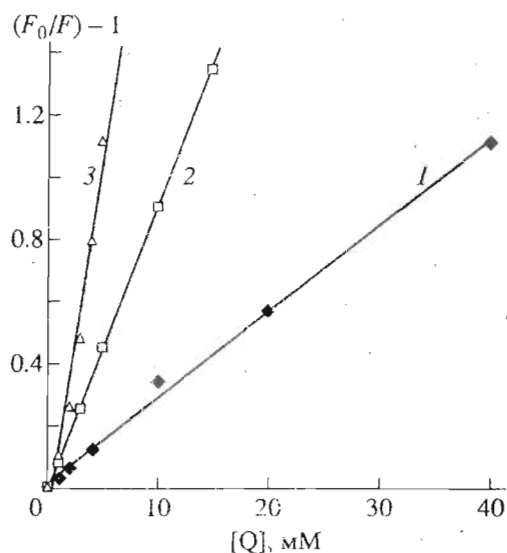


Рис. 2. Тушение флуоресценции 5 мкМ раствора гидрохлорида 9-аминоакридина в этаноле перфторароматическими азидами. Зависимость величины  $(F_0/F) - 1$  от концентрации тушителя  $[Q]$ .  $\lambda_{\text{возб}} = 400 \pm 3$  нм;  $\lambda_{\text{исп}} = 450 \pm 3$  нм;  $F_0$  и  $F$  – интенсивность флуоресценции в отсутствие и присутствии тушителя. 1 – (IX), 2 – (IV), 3 – (III).

кой реакционной способностью по отношению к нуклеиновым кислотам [9].

Синглет-синглетная сенсibilизация, основанная на безызлучательном переносе энергии возбужденного состояния донора к акцептору, более перспективна. Среди известных флуоресцентных красителей, способных к синглет-синглетной передаче энергии, для исследования нами выбран 9-аминоакридин [17]. Для оценки тушения флуоресценции этого соединения как характеристики возможности переноса энергии от донора к акцептору мы применили уравнение Штерна-Фольмера [18]:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{каж}} \cdot [Q],$$

где  $F_0$  и  $F$  – интенсивность флуоресценции в отсутствие и присутствии тушителя соответственно;  $[Q]$  – концентрация тушителя;  $K_{\text{каж}}$  – кажущаяся константа тушения.

Исходя из данных по тушению флуоресценции 9-аминоакридина в этанольном растворе различными перфторароматическими азидами (рис. 2) по уравнению Штерна-Фольмера оценили величину  $K_{\text{каж}}$ : для эфира (IX)  $25 \text{ M}^{-1}$ , для оксима (IV)  $90 \text{ M}^{-1}$  и для гидразона (III)  $190 \text{ M}^{-1}$ . Увеличение  $K_{\text{каж}}$  коррелирует с батохромным сдвигом этих азидов.

Из изученных перфторарилазидов тушение флуоресценции более эффективно осуществляется гидразоном (III), и в связи с этим нами исследован сенсibilизированный 9-аминоакридином к

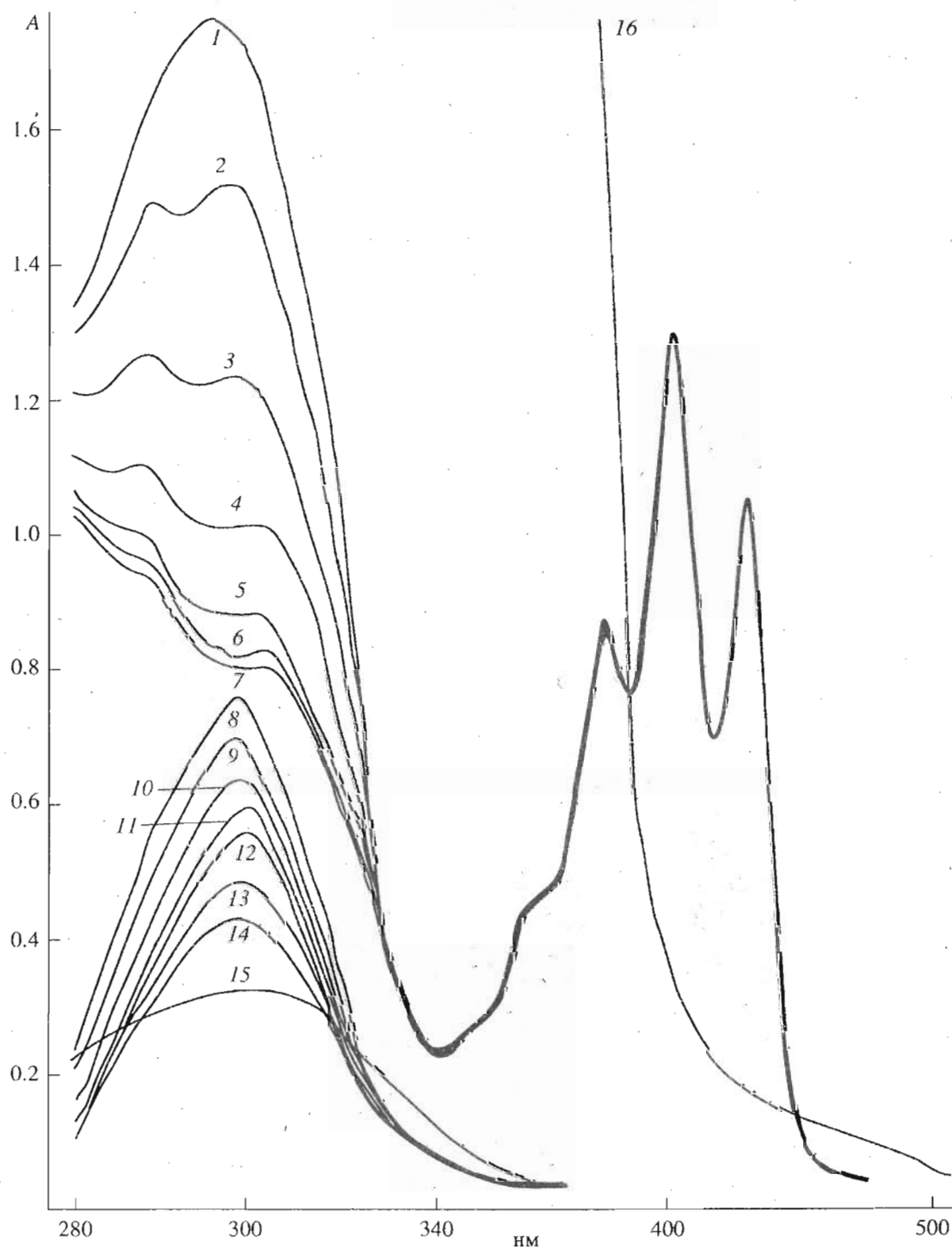
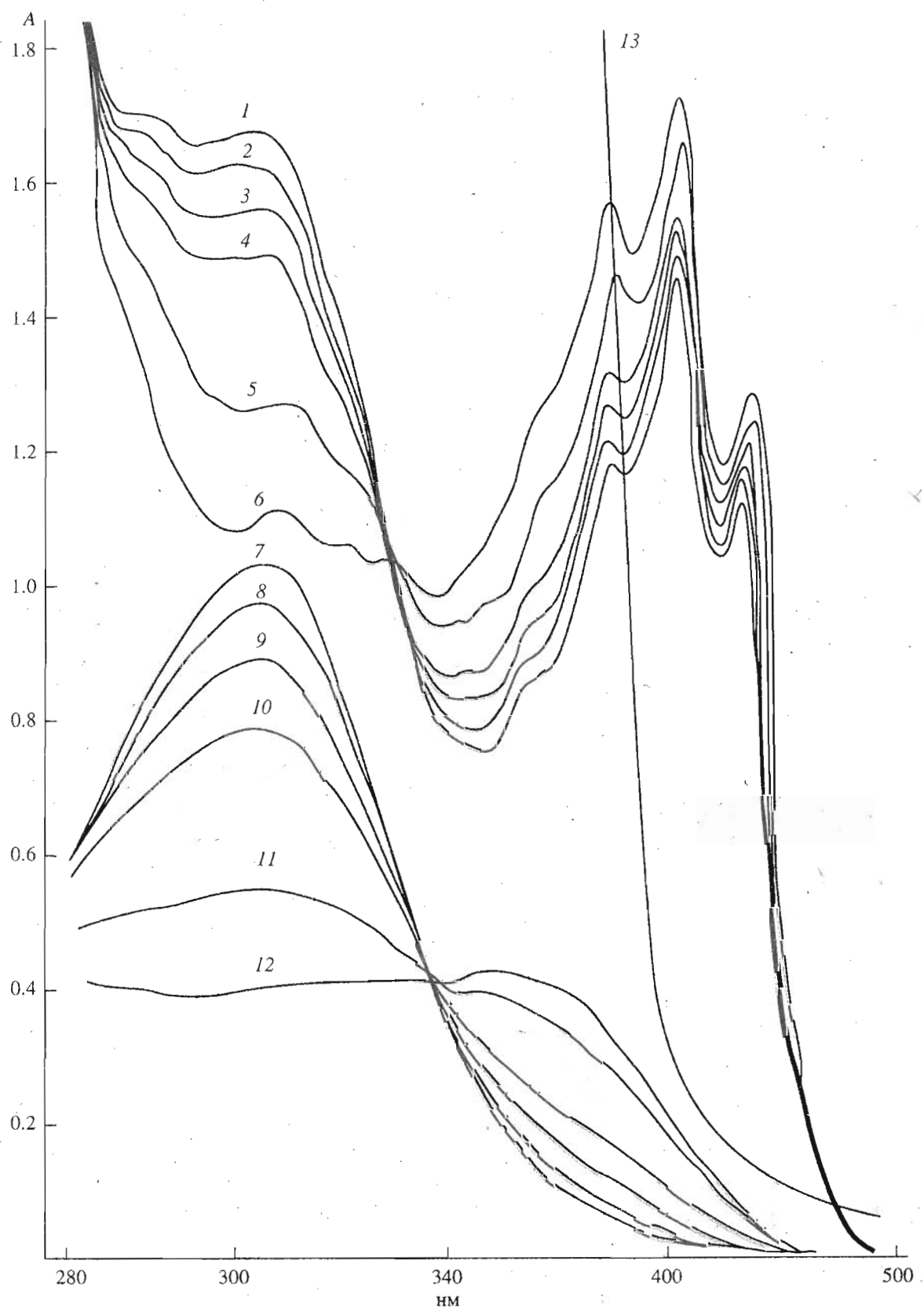


Рис. 3. Прямой (8–15) и sensibilizированный гидрохлоридом 9-аминоакридина (1–7) фотолиз гидразона (III) в метаноле при облучении видимым светом  $>400$  нм. Показаны спектры поглощения в зависимости от времени облучения (мин): 1, 8 – 0; 2 – 20; 3 – 60; 4 – 120; 5 – 180; 6 – 240; 7 – 300; 9 – 60; 10 – 120; 11 – 240; 12 – 300; 13 – 400; 14 – 600; 15 – 1000. Кривая 16 – поглощение светофильтра ЖС-10 ( $>400$  нм).

видимому свету фотолиз гидразона (III) и 2-нитро-5-азидобензойной кислоты (XI), обладающих близкими спектральными свойствами. Полученные данные (рис. 3, 4) свидетельствуют о том, что при облучении видимым светом скорость фотолиза ги-

дразона (III) значительно возрастает при sensibilizации, а для арилазида (XI) несколько падает.

Оценка времен полуфотолиза показала, что  $\tau_{1/2}$  sensibilizированного фотолиза соединения (III) уменьшилось в 7 раз по сравнению с прямым



**Рис. 4.** Прямой (7-12) и sensibilizированный гидрохлоридом 9-аминоакридина (1-6) фотолиз арилазида (XI) в метаноле при облучении видимым светом  $>400$  нм. Показаны спектры поглощения в зависимости от времени облучения (мин): 1, 7 - 0; 2, 8 - 5; 3, 9 - 15; 4, 10 - 30; 5, 11 - 90; 6, 12 - 270. Кривая 13 - поглощение светофильтра ЖС-10.

фотолизом, в то время как для арилизидов (XI)  $\tau_{1/2}$  увеличилось в 1.5 раза, т.е. перфторариллизиды более склонны к сенсibilизации, чем нефторированные азиды. Различное поведение, вероятно, связано с сильными акцепторными свойствами атомов фтора.

Ускорение сенсibilизированного фотолиза (III) при комплементарно-адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот может быть значительно больше, так как эффективность переноса энергии зависит от расстояния между донором и акцептором, т.е. от их концентрации, а в представленных экспериментах использовались низкие спектрофотометрические концентрации ( $8 \times 10^{-5}$  М), которые значительно ниже локальных концентраций реакционных центров в комплементарных комплексах.

Полученные результаты показывают возможность и перспективность использования сенсibilизации перфторариллизидов для разработки фотореагентов, чувствительных к видимому свету, для фотомодификации нуклеиновых кислот, и работа в этом направлении в настоящее время нами проводится.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали гидрохлорид метилового эфира  $\beta$ -аланина, семигидрохлорид *O*-(карбоксиметил)гидроксиламина и *N*-гидрокси-сукцинимид (Fluka AG, Швейцария); *n*-азидотетрафторбензальдегид (VI) был получен как описано ранее [19], а хлоргидрат *O*-(4-аминобутил)гидроксиламина — как описано в работе [20].

Запись <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров проводили на спектрометре Bruker WP-200-SY (Bruker, ФРГ), УФ-спектров — на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss, ГДР), ИК-спектров в таблетках KBr на приборе Specord M80 (Carl Zeiss, ГДР). Спектры флуоресценции для растворов в этаноле записывали на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4.

ТСХ выполняли на пластинках Silufol UV-VIS в следующих системах: этанол-хлороформ, 1 : 10 (А); диоксан-бензол, 1 : 9 (Б); этанол-25% аммиак, 6 : 4 (В).

Фотохимические свойства азидов изучали, облучая образцы неконденсированным светом ртутной лампы высокого давления ДРК-120 осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург), фильтрованным следующими наборами стеклянных светофильтров ( $\lambda$ , нм;  $W$ , Вт см<sup>-2</sup>): УФС-5 (254-400;  $5 \times 10^{-4}$ ); БС-12, УФС-1 (303-365;  $3 \times 10^{-4}$ ); БС-6, УФС-6 (334-365;  $2 \times 10^{-4}$ ); ЖС-3, УФС-2 (303-313;  $1 \times 10^{-4}$ ) и ЖС-10 (>400;  $1 \times 10^{-3}$ ). Мощность излучения лампы ( $W$ ) на разных длинах волн определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [21].

***O*-(Карбоксиметил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксим (V).** Раствор 545 мг (5 ммоль) семигидрохлорида *O*-(карбоксиметил)гидроксиламина в 10 мл 50% метанола медленно прибавляли по каплям к раствору 1100 мг (5 ммоль) *n*-азидотетрафторбензальдегида (VI) в 3 мл метанола. Выдерживали 30 мин, отфильтровывали выпавший белый осадок соединения (V), промывали его 50% метанолом (2  $\times$  1 мл) и 1 мл воды. Осадок высушивали в вакууме в затененном месте. Получили 1315 мг (90%) азид (V), т. пл. 148-149°C (с разл.),  $R_f$  0.6-0.7 (А). Спектр ПМР (в DMF-*d*<sub>7</sub>),  $\delta$ , м. д.: 8.70 (1H, с, CH=N); 5.11 (2H, с, O-CH<sub>2</sub>-C=O). ИК-спектр (в KBr),  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3040 сл. (CH), 2930 сл. (CH<sub>2</sub>), 2200 и 2130 с. (N<sub>3</sub>), 1730 с. (НОС=O), 1650 ср. (C=NO), 1495 и 1470 с. (аром. C=C), 1250 с. (O-CH<sub>2</sub>), 990 с. (C-F). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 212 (7000), 289 (31000). Найдено, %: С 36.9; Н 1.64. C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 36.9; Н 1.56.

***O*-[(Сукцинимидо-*N*-окси)карбонилметил]-*n*-азидотетрафторбензальдоксим (I).** В 5 мл сухого DMF последовательно растворяли 403 мг (2 ммоль) DCC, через 1 ч 365 мг (1.25 ммоль) соединения (V) и 145 мг (1.27 ммоль) HO<sub>2</sub>Su. Через 1 ч реакционную смесь помещали в холодильник и выдерживали 24 ч. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха. Продукт перекристаллизовывали из 12 мл смеси гексан-хлороформ (2 : 1) и высушивали в вакууме. Получали 312 мг (64%) азид (II), т. пл. 94-96°C,  $R_f$  0.67-0.75 (В). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (в CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м. д.: 8.28 (1H, с, Ar-CH=N); 5.09 (2H, с, O-CH<sub>2</sub>-C=O); 2.84 (4H, м, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>). ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 2925 сл. (CH<sub>2</sub>), 2175 и 2125 с. (N<sub>3</sub>), 1825 с. (НОС=O), 1790 с. (ОНС=O), 1650 ср. (C=NO), 1480 и 1495 с. (аром. C=C), 1240 с. (O-CH<sub>2</sub>), 995 с. (C-F). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 208 (15000), 287 (26000). Найдено, %: С 39.7; Н 1.72; N 18.2. C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>F<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>. Вычислено, %: С 40.1; Н 1.81; N 18.0.

***O*-(*N*-*n*-Бутилкарбаомилметил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксим (IV).** Растворяли 130 мг (0.7 ммоль) DCC в 2 мл сухого DMF, через 1 ч прибавляли 154 мг (0.5 ммоль) соединения (V) и 53 мкл (0.53 ммоль) *n*-бутиламина. Через 1 ч перемешивания реакционную смесь помещали в холодильник (-5°C). Через 24 ч осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали, в остаток прибавляли 5 мл диэтилового эфира и помещали в холодильник. Через 72 ч осадок амида (IV) отфильтровывали, промывали 2 раза по 0.5 мл эфира и высушивали в вакууме. Получили 106 мг (60%) азид (IV),  $R_f$  0.77 (Б). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (в CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м. д.: 8.27 (1H, с, Ar-CH=N-O); 4.86 (2H, с, O-CH<sub>2</sub>-C=O); 2.85 (2H, м, CH<sub>2</sub>-NH-CO); 1.79 (4H, м, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 0.88 (3H, м, CH<sub>3</sub>). ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3440 сл. (N-H); 2940 с. (C-H<sub>2</sub>); 2140 с. (N<sub>3</sub>);

1700 с. (NC=O); 1650 с. (C=NO); 1480 с. (аром. C=C); 1240 с. (O-CH<sub>2</sub>); 1010 с. (C-F). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 208 (11500), 287 (26000).

**Гидрохлорид О-(4-аминобутил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксима (II).** К раствору 525 мг (3 ммоль) дигидрохлорида 4-аминобутил-О-гидроксиламина в 1.5 мл воды прибавляли последовательно 3.5 мл метанола и медленно раствор *n*-азидотетрафторбензальдегида в 2 мл метанола. Через 15 мин к реакционной смеси прибавляли 3 мл воды и помещали в холодильник на 2 ч. Раствор фильтровали и фильтрат упаривали досуха. Остаток растворяли в 20 мл хлороформа и осаждали 7 мл эфира. Осадок продукта (II) отфильтровывали, перекристаллизовывали из хлороформа и высушивали в вакууме в затененном месте. Получали 615 мг (45%) азиды (II),  $R_f$  0.83 (А). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (в CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м. д.: 8.38 (3H, шир. с., -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 8.13 (1H, с, Ar-CH=NO); 4.24 (2H, м, CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 3.05 (2H, м, CH<sub>2</sub>-O); 1.86 (4H, м, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>). ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 2930 ср. (CH<sub>2</sub>); 2170 и 2120 с. (N<sub>3</sub>); 1640 сл. (C=N); 1480 и 1450 с. (аром. C=C). УФ-спектр (в воде),  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 209 (9000), 289 (31500). Найдено, %: С 38.5; Н 3.54; N 20.7. C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O. Вычислено, %: С 38.6; Н 3.54; N 20.5.

**Дигидрохлорид 3-аминопропионилгидразида (VII).** Раствор 280 мг (2 ммоль) гидрохлорида метилового эфира  $\beta$ -аланина в 1 мл 30% гидразингидрата в этаноле нагревали на водяной бане 2.5 ч при 70°C. Реакционную смесь наносили на колонку (1 × 20 см) с силикагелем, промывали 20 мл смеси этанол – 25% аммиак (9 : 1), а затем элюировали смесью этанол – 25% аммиак (6 : 4). Фракции, содержащие гидразид (VII), упаривали при 40°C. К остатку прибавляли 7 мл 0.5 М HCl и упаривали досуха. Продукт перекристаллизовывали из 12 мл 80% этанола. Получили 150 мг (47%) гидразида (VII),  $R_f$  0.27 (В), т. пл. 220–224°C (с разл.). Литературные данные: т. пл. 222–224°C [22]. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (в D<sub>2</sub>O),  $\delta$ , м. д.: 3.28 (2H, т,  $J$  6.5 Гц, C-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>); 2.74 (2H, т,  $J$  6.5 Гц, C-CH<sub>2</sub>-C=O). ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3000 с. (CH<sub>2</sub>); 1680 с. (NC=O); 1590 ср. (OCN-H); 1510 с. (OC-NH).

**Гидрохлорид N-(3-аминопропил)-*n*-азидотетрафторбензальдегида (III).** К раствору 122 мг (0.7 ммоль) гидразида (VII) в 800 мкл 50% этанола прибавляли раствор 154 мг (0.7 ммоль) *n*-азидотетрафторбензальдегида в 1.2 мл этанола. Через 1–2 мин начинал выпадать обильный белый осадок. Через 10 мин реакционную смесь помещали в холодильник (–5°C). Через 24 ч осадок (III) отфильтровывали, промывали 2 раза по 200 мкл холодного этанола и высушивали в вакууме в затененном месте. Получили 165 мг (75%) азиды (III),  $R_f$  0.85 (Б). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (в D<sub>2</sub>O),  $\delta$ , м. д.: 8.16 и

8.00 (1H, с, Ar-CH=N); 3.29 (2H, т,  $J$  7.0 Гц, CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 2.77 (2H, т,  $J$  7.0 Гц, NCO-CH<sub>2</sub>). ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3440 сл. (N-H); 3060 сл. (аром. C-H); 2980 ср. (CH<sub>2</sub>); 2140 с. (N<sub>3</sub>); 1680 с. (NC=O); 1585 с. (аром. C=C); 1395 ср. (CO-NH); 1005 ср. (C-F). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 207 (11000); 307 (35500). Найдено, %: С 35.5; Н 2.59; N 24.6. C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O. Вычислено, %: С 35.3; Н 2.66; N 24.7.

**Фотолиз арилазидов.** Изучение спектральной светочувствительности проводили облучением этанольных растворов арилазидов при разных длинах волн. Концентрации всех азидов составляли 0.1–0.05 мМ. Фотолиз в пиридине осуществляли при концентрации азидов 0.2 мМ с использованием светофильтров ЖС-3, УФС-2 в кюветах толщиной 0.1 см. Сенсibilизированный гидрохлоридом 9-аминоакридина фотолиз проводили в метаноле при облучении через светофильтр ЖС-10, концентрации компонентов 0.08 мМ. Фотореагенты облучали до прекращения изменений в спектре электронного поглощения или до резкого нарушения изобестических точек. Время полуфотолиза ( $\tau_{1/2}$ ) оценивали по изменению оптической плотности при  $\lambda_{\text{макс}}$  в зависимости от времени облучения.

Настоящая работа поддержана Международным научным фондом (Фонд Сороса) (грант № RCU 300) и грантом Государственной научнотехнической программы “Новейшие методы биоинженерии” (направление “Ген-направленные биологически активные вещества”, проект 2, грант № 6).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галль А.А., Иванова Т.М., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1991. Вып. 4. С. 27–31.
2. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18–23.
3. Purvis R., Smalley R.K., Strachan W.A., Suschitzky H. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1978. P. 191–195.
4. Грицан Н.Р., Притчина Е.А. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 910–939.
5. Починок А.В., Починок В.Л., Авраменко А.Д., Кондратенко Р.А., Скопенко В.Н., Нагорный В.Н., Чибисова Н.П. // Укр. хим. журн. 1979. Т. 45. С. 1204–1211.
6. Keana J.F.W., Cai S.X. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 3640–3645.
7. Saundararajan N., Platz M.S. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 2034–2044.
8. Schnapp K.A., Poe R., Leyva E., Saundararajan N., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 172–177.
9. Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.А., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Бюорган. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.



10. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1196.
11. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 21–29.
12. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 30–39.
13. Keana J.F.W., Cai S.X. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 3640–3647.
14. Добриков М.И., Шишкин Г.В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. Вып. 6. С. 50–57.
15. Poe R., Schnapp K., Young M.J.T., Grayzar J., Platz M.S. // J. Amer. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 5054–5067.
16. Schnapp K.A., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 178–183.
17. Nielsen P.E., Jeppesen C., Egholm M., Buchardt O. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 3877–3888.
18. Лакович Дж. // Основы флуоресцентной спектроскопии: Пер. с англ. М.: Мир, 1986. С. 262–344.
19. Михалина Т.В., Фокин Е.П. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1988. Вып. 3. С. 92–95.
20. Адаричев В.А., Дымищ Г.М., Калачиков С.М., Поздняков П.И. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. С. 1066–1069.
21. Калверт Дж., Пумтс Дж. Фотохимия: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 625–627.
22. Yale H.L., Losee K., Martins J., Holsing M., Perry F.M., Bernstein J. // J. Amer. Chem. Soc. 1953. V. 75. P. 1933–1942.

## Reagents for Directed Modification of Biopolymers. VI.<sup>1</sup> Substituted Oximes and Hydrazone of *p*-Azidotetrafluorobenzaldehyde: Synthesis, Spectral Properties, and Direct and Sensitized Photolysis

M. I. Dobrikov,<sup>2</sup> R. Yu. Dudko, and G. V. Shishkin

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

**Abstract**—New heterobifunctional reagents *O*-[(succinimido-*N*-oxy)carbonylmethyl]-*p*-azidotetrafluorobenzaldoxime (**I**), *O*-(4-aminobutyl)-*p*-azidotetrafluorobenzaldoxime hydrochloride (**II**), *N*-(3-aminopropionyl)-*p*-azidotetrafluorobenzalhydrazone hydrochloride (**III**), and *O*-(*N*-*n*-butylcarbamoylmethyl)-*p*-azidotetrafluorobenzaldoxime (**IV**) were synthesized. Photolysis of the reagents in ethanol and pyridine at various wavelengths was studied. In spectral characteristics and photoreactivity, compounds (**I**)–(**III**) are promising heterobifunctional reagents for introducing photoreactive groups into biopolymers. The singlet–singlet sensitization of photolysis of hydrazone (**III**) with 9-aminoacridine was studied, and the possibility of producing photoreagents sensitive to visible light was shown.

*Key words:* perfluoroaromatic azides; sensitization; photolysis; nucleic acids, photomodification.

<sup>1</sup> For communication V, see [1].

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.