



УДК 541.145:542.958.1

НОВЫЕ ФОТОЛАБИЛЬНЫЕ РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ (ТРИФТОРМЕТИЛ)ДИАЗИРИНОВУЮ ГРУППУ

© 2003 г. М. Т. Мчедлидзе^{*,#}, Н. В. Сумбатян^{*},

Д. А. Бондарь^{*}, М. В. Тараненко^{*}, Г. А. Корщунова^{**}

^{*} Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы;

^{**} Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 21.12.2001 г. Принята к печати 29.03.2002 г.

Впервые синтезированы фотореагенты для метода фотокросслинкинга, содержащие одновременно (трифторметил)диазириновую и *o*-нитробензильную группы. Изучены фотохимические свойства соединений и показана возможность селективной активации диазириновой группы и нитробензильного линкера.

Ключевые слова: (трифторметил)диазирины; расщепляемые фотоактивируемые реагенты; фотолит.

ВВЕДЕНИЕ

Фотоаффинная модификация – важный подход для исследования взаимодействий между биологическими молекулами [1]. При облучении фототлабильная группа одной из взаимодействующих молекул генерирует высокорекреационноспособную частицу, которая атакует соседние группы атомов с образованием сшивки. Изучение получаемых ковалентных комплексов дает информацию о структурной организации системы, а также о природе реагирующих молекул [2–4]. Однако успешная идентификация продуктов сшивки ограничена трудностями их выделения и анализа. Приблизиться к решению этой проблемы можно с помощью фотореагентов, способных после образования ковалентной связи с биологической молекулой специфически расщепляться (рис. 1). Такие реагенты позволяют удалить балластную часть лиганда, облегчая тем самым детекцию и выделение образующихся продуктов.

Известны фотореагенты, содержащие помимо (трифторметил)диазириновой ряд химически расщепляемых групп – *цис*-диольную, дисульфидную, сложноэфирную [5–12]. Их расщепление происходит под действием химических агентов, что накладывает существенные ограничения на их применение для изучения молекулярно-биологических систем. Альтернативный подход осно-

ван на использовании соединений, содержащих фоторасщепляемый сайт, т.е. группу, расщепляющуюся под действием УФ-облучения. Впервые Фангом и др. [13] был синтезирован бифункциональный реагент, содержащий две группировки (*m*-нитрофеноксид и (трифторметил)диазириновую), способные селективно расщепляться под действием света с длиной волны 350 нм при разных значениях pH.

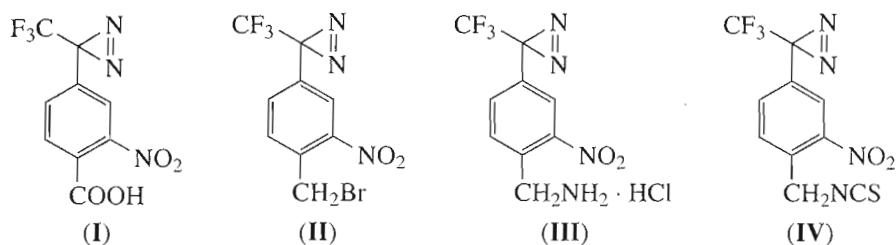
В данной работе предложены новые фотоактивируемые расщепляемые реагенты (I)–(IV). Они содержат две фототлабильные функции, активируемые под действием УФ-облучения: *n*-(трифторметил)диазириновую, обеспечивающую ковалентное связывание в месте точечного контакта молекул, и *o*-нитробензильную, позволяющую отщепить балластную часть лиганда. Изучены фотохимические свойства соединений и показана возможность селективной активации диазириновой и нитробензильной групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор диазириновой группы в качестве фототлабильной функции не случаен: ее фотолит протекает с образованием высокорекреационного карбена в мягких условиях (длина волны 350–360 нм), что не вызывает повреждения биологических молекул. Кроме того, эта группа стабильна в широком диапазоне условий, в тиольных буферах с pH от 0 до 14. Расщепляемый сайт – *o*-нитробензильная группа – способна разлагаться под действием УФ-света той же длины волны и широко используется для синтеза фототлабильных защитных

Сокращения: DCC – *N,N*-дидциклогексилкарбодимид; Вос – трет-бутилоксикарбонил; NBS – *N*-бромсукцинимид; ТСХ – тонкослойная хроматография.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-55-20; эл. почта: malapa_m@imail.ru).



групп, смол с фотолабильными линкерами для твердофазного синтеза, фоторасщепляемых конъюгатов пептидов с олигонуклеотидами [14–18].

Синтез реагентов (I) и (II) представлен на схеме 1. Исходный 4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазири-3-ил]толуол (V) получен по усовершенствованному методу Нассалья [19–21]. Синтез 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазири-3-ил]толуола (VI) осуществляли действием нитрующей смеси (HNO₃/H₂SO₄) на соединение (V) при 0°C. Проведение реакции при низкой температуре позволяет избежать образования побочного динитропроизводного и получить с хорошим выходом целевой продукт (VI).

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазири-3-ил]бензойная кислота (I) получена окислением соединения (VI) по аналогии с методом, который применялся для окисления диазириносодержащих реагентов [19]. В качестве окислителя использовался перманганат калия в смеси пиридин/вода. Невысокий выход реакции (31%) связан, по-видимому, с частичным разрушением диазиринового цикла при длительном нагревании и большими потерями на стадии очистки.

Попытки получения 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазири-3-ил]бензилбромида (II) путем бромирования соединения (VI) не увенчались успехом. Были опробованы условия жесткого радикального бромирования, однако, образования продукта не наблюдалось и из реакционной смеси было выделено исходное вещество. Был предложен альтернативный подход – синтез 4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазири-3-ил]бензилбромида (VII) бромированием модифицированного толуола (V)

с последующим нитрованием с образованием целевого продукта (II). Бромирование (V) проводили NBS по методике из работы [20].

Реагент (II) получен нитрованием замещенного бензилбромида (VII) азотной кислотой. Было установлено, что использование азотной кислоты, содержащей окислы азота, способствует образованию большого количества побочных продуктов. Такая же тенденция наблюдалась и при проведении реакции в температурном интервале от 0 до +5°C, в то время как при существенном понижении температуры (до –20°C) реакция идет не до конца. На основе проделанных модельных опытов были определены оптимальные условия синтеза: это использование 90% азотной кислоты, освобожденной от окислов азота, и проведение реакции при температуре –5 ... –10°C. Тем не менее при анализе реакционной смеси с помощью ТСХ было обнаружено три продукта с *R_f* 0.57, 0.4 и 0.3. Целевой продукт (*R_f* 0.4) удалось выделить из реакционной смеси колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 33%. Структура соединения (II) доказана с помощью масс-, УФ- и ИК-спектromетрии.

Гидрохлорид 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазири-3-ил]бензиламина (III) синтезировали с помощью модифицированной реакции Делепина [22]. Классический синтез предполагает взаимодействие бромпроизводного с уротропином в спирте и последующее разложение уротропиниевой соли газообразным хлористым водородом. Применение этой методики дает целевой амин с выходом 40%. Использование в качестве растворителя хлороформа [23] вместо

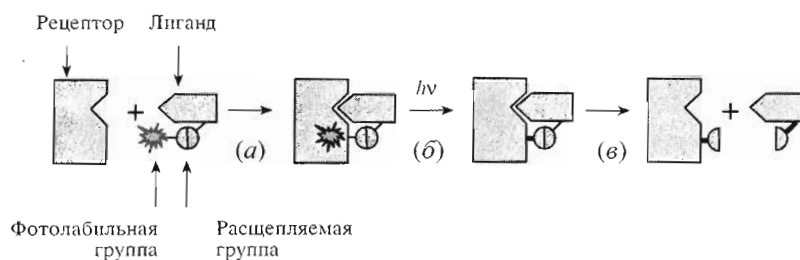


Рис. 1. Принцип метода фотоаффинной модификации с использованием расщепляемого реагента: а) образование нековалентного комплекса лиганд–рецептор; б) образование ковалентного комплекса под действием облучения; в) расщепление (под действием света или химических агентов) и удаление балластной части лиганда из лиганд-рецепторного комплекса.

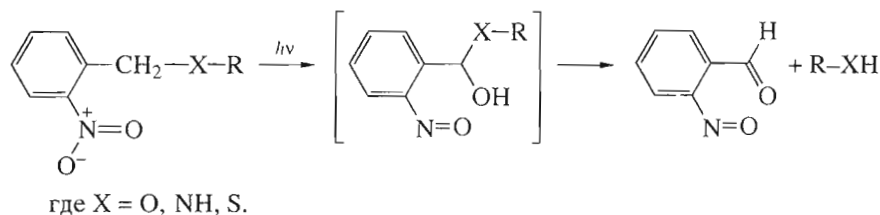


Схема 3. Расщепление *o*-нитробензильного производного под действием УФ-света.

температуре. В реакциях конденсации с DCC образуется дициклогексилмочевина, которая обычно выпадает в осадок и может быть легко удалена из реакционной смеси. Однако в данном случае выпадения осадка не наблюдалось. Это связано с тем, что образующаяся в ходе реакции дициклогексилтиомочевина хорошо растворима в органических растворителях. Справиться с этой проблемой удалось применением колоночной хроматографии на силикагеле (см. “Эксперимент. часть”).

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазириин-3-ил]бензиламид *N*^α-Вос-аланина (X) получен реакцией амина (III) с Вос-аланином в присутствии DCC. Нингидриновый тест продукта реакции после отщепления Вос-группы показал наличие в полученном соединении аминогруппы, в УФ-спектре наблюдался пик, соответствующий диазириновому циклу (363 нм, ε 170 М⁻¹см⁻¹).

В электронных спектрах поглощения этанольных растворов диазиринов (I)–(IV) наблюдается характерная полоса с максимумом поглощения в области 342–353 нм (ε 160–640 М⁻¹см⁻¹) (табл. 1), что хорошо согласуется с литературными данными [19, 26, 27]. Облучение УФ-светом с длиной волны около 360 нм приводит к фотолитическому разложению диазириновой группы с образованием карбена. При этом в спектрах соединений с увеличением времени облучения наблюдается снижение интенсивности в области максимума поглощения, соответствующего диазириновому циклу. Период полураспада определяется как время, за которое половина молекул претерпевает фотолитическое разложение. Зная величину интенсивности падающего света, можно определить квантовый выход (φ) разложения фотолабильной группы:

$$\phi = \Delta m / \Delta n,$$

где Δ*n* – количество квантов света, поглощенных за определенное время, а Δ*m* – число молей прореагировавшего за то же время диазирина.

$\Delta n = I_{\text{полл}} t = I_0 \epsilon l c t$ (*I*_{полл} – интенсивность света, поглощенного веществом, квант/с; *I*₀ – интенсивность света, падающего на реакционный сосуд, квант/с; ε – молярный коэффициент поглощения вещества, М⁻¹см⁻¹; *c* – концентрация вещества,

моль/л; *l* – толщина поглощающего слоя, см; *t* – время облучения, с);

$\Delta m = \Delta c N_A V = \Delta A / \epsilon N_A V$ (Δ*c* – изменение концентрации вещества, моль/л; Δ*A* – изменение оптического поглощения, *N*_A – число Авогадро, моль⁻¹; *V* – объем раствора, мл).

Фотолиз соединений, содержащих *o*-нитробензильную группу, протекает по механизму внутримолекулярного окисления-восстановления, как показано на схеме 3. При этом происходит образование *o*-нитрозобензальдегида, что можно наблюдать по УФ-спектрам, в которых наблюдается появление пика в области 300–400 нм, соответствующее поглощению нитрозогруппы [28].

Кинетика селективного фоторазложения диазириновой группы и нитробензильного линкера изучена нами на примере 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазириин-3-ил]бензиламида *N*^α-Вос-аланина (X). Соединение (X) – упрощенная модель фотоактивированного аналога белковой молекулы для изучения нуклеиново-белковых и белок-белковых взаимодействий.

Исследование проводилось с помощью УФ-спектров этанольного раствора соединения (X), зарегистрированных при различном времени облучения. В качестве источника света применяли

Таблица 1. Данные УФ-спектров синтезированных фотореагентов (I)–(IV)

Соединение	λ_{max} , нм	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹
(I)	256	19900
	291	1300
	343	200
(II)	251	12600
	295	1300
	342	160
(III)	220	5500
	260	1800
	353	330
(IV)	220	8400
	246	11600
	353	640

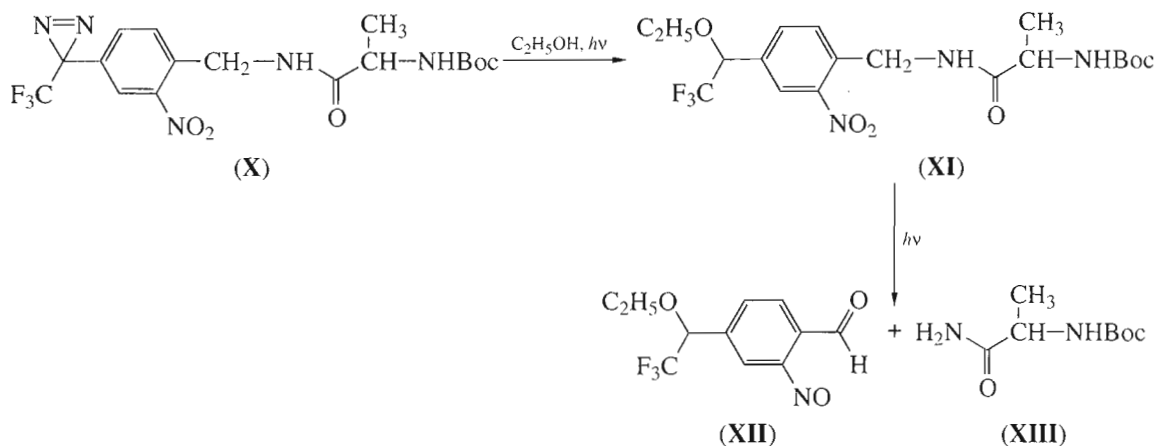


Схема 4. Схема УФ-фотолиза 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]бензиламида *N*^α-Вос-аланина (X).

ртутную лампу, излучающую монохроматический свет с длиной волны 365 нм. В течение первых 25 мин фотолиза наблюдалось снижение интенсивности пика при 363 нм, соответствующего диазириновой группе (рис. 2а). Четкие изобестические точки в УФ-спектрах свидетельствуют о протекании фотохимической реакции первого порядка. Как известно из литературных данных [29], при фотолизе диазиринов в спиртах образуются продукты внедрения карбена по связи О–Н. Поэтому основным продуктом начального этапа фотолиза соединения (X) является, по-видимому, 2-нитро-4-(2,2,2-трифтор-1-этоксиэтил)бензиламид *N*^α-Вос-аланина (XI) (схема 4). С увеличением времени облучения наблюдалось появление и увеличение максимума поглощения при 358 нм

(рис. 2б), соответствующего нитрозогруппе, что свидетельствовало о разложении нитробензильной группы с образованием предположительно 2-нитрозо-4-(2,2,2-трифтор-1-этоксиэтил)бензальдегида (XII), а также амида *N*^α-Вос-аланина (XIII), который был обнаружен с помощью ТСХ-контроля исследуемого раствора после облучения.

В табл. 2 приведены данные, характеризующие фотохимические свойства диазириновой и нитробензильной групп в составе соединения (X). Как видно из табл. 2, времена полураспада ($\tau_{1/2}$) и квантовые выходы (ϕ) разложения диазириновой и нитробензильной групп различаются на порядки. Это позволяет говорить о селективности фотораспада, при котором сначала происходит разложение диазириновой группы с образованием

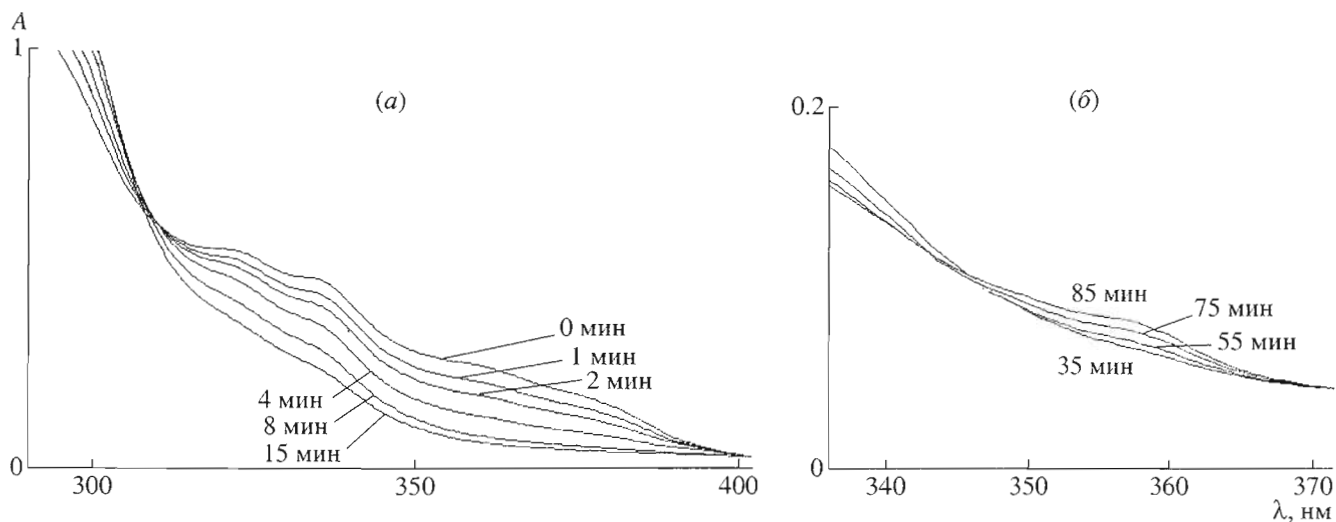

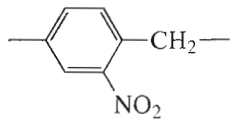


Рис. 2. Кинетика фотолиза 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]бензиламида *N*^α-Вос-аланина (X): показаны спектры поглощения раствора (X) в этаноле (*c* 1.35 мМ) при различных временах облучения: (а) снижение интенсивности пика при 363 нм, соответствующего диазириновой группе, 0–15 мин; (б) увеличение поглощения при 358 нм (пик соответствует нитрозогруппе), 35–85 мин.

Таблица 2. Кинетические характеристики фотолиза 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]бензиламида *N*^α-Вос-аланина (X)

Фотолabile группа	$\tau_{1/2}$, мин	k , мин ⁻¹	ϕ
	7.4 ± 1.4	$(9.3 \pm 1.7) \times 10^{-2}$	0.98 ± 0.33
	66.9 ± 15.8	$(1.03 \pm 0.23) \times 10^{-2}$	0.109 ± 0.032

короткоживущего карбена, а затем – разложение нитробензильного линкера.

Таким образом, предложенные соединения являются новыми расщепляемыми фотоактивируемыми реагентами, содержащими (трифторметил)диазириновую группировку. Наличие химически активных групп (карбоксильной в (I), бромметильной во (II), аминной в (III), изотиоцианатной в (IV)) позволяет использовать предложенные реагенты для модификации амино-, карбоксильных и сульфгидрильных групп в составе лигандов биологических молекул в целях последующего изучения их контактов методом фотоаффинной модификации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системах растворителей: петролейный эфир–хлороформ, 65 : 10 (А); гексан–этилацетат, 4 : 1 (Б); хлороформ–гексан, 2 : 1 (В); бензол–ацетон–уксусная кислота, 50 : 25 : 2 (Г); гексан (Д). Вещества на хроматограммах обнаруживали по УФ-поглощению.

Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Kieselgel 60 (70–230 меш., Merck).

ИК-спектры регистрировали на приборе Specord 40.

Масс-спектры снимали на приборе Finnigan Mat INCOS 50 при ионизации электронным ударом.

УФ-спектры соединений регистрировали на спектрофотометре Aminco DW 2000. Спектры снимали в однолучевом режиме при скорости сканирования 3 нм/с в интервале длин волн 200–550 нм. Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Синтез соединений, содержащих (трифторметил)диазириновую группу, осуществляли при умеренном освещении.

4-[3-(Трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]толуол (V) получали по методу [19]. 4-[3-(Трифторме-

тил)-3*H*-диазирин-3-ил]бензилбромид (VII) синтезировали по методике [20] с 74% выходом.

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]толуол (VI). К 400 мг (2 ммоль) охлажденного до 0°C 4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]толуола (V) осторожно при перемешивании добавляли по каплям 1.4 мл конц. (95%) серной кислоты. Затем добавляли по каплям нитрующую смесь (97% HNO₃–дымщ. HNO₃–конц. H₂SO₄/0.29 мл : 0.1 мл : 0.55 мл). Реакционную смесь перемешивали 1 ч, затем переносили в лед и экстрагировали эфиром (2 × 10 мл). Эфирные вытяжки промывали 10% раствором бикарбоната натрия (2 × 10 мл) и водой (2 × 10 мл). Эфирный раствор сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель упаривали и получили продукт в виде светло-желтого масла. Выход продукта 350 мг (70%). *R_f* 0.75 (А), 0.22 (Д). УФ (эфир): λ_{\max} 250 нм (lg ϵ 4.0), λ_{\max} 288 нм (lg ϵ 3.0), λ_{\max} 358 нм (lg ϵ 2.3), МС: *m/z*, 245 [M]⁺.

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил]бензойная кислота (I). 350 мг (1.4 ммоль) соединения (VI) растворяли при перемешивании в 10 мл пиридина и 7 мл воды. Добавляли 1 г (5.6 ммоль) перманганата калия и перемешивали при 50°C в течение 15 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли 50 мл воды и подкисляли 1 н. серной кислотой до pH 2. Добавляли насыщенный раствор Na₂S₂O₅ до полного обесцвечивания раствора. Проводили экстракцию эфиром (2 × 100 мл). Эфирный слой отделяли и добавляли к нему 1 н. NaOH до pH 10. Экстрагировали водой, водный слой подкисляли 1 н. серной кислотой до pH 2. Проводили повторную экстракцию эфиром, эфирные вытяжки сушили над безводным сульфатом натрия. Эфир упаривали, остаток растворяли в 8 мл этанола и осаждали 25 мл воды. Получили продукт в виде белого кристаллического вещества. Выход 120 мг (31%). *R_f* 0.27 (Б). УФ (гексан): λ_{\max} 256 нм (lg ϵ 4.3),

λ_{\max} 291 нм ($\lg \epsilon$ 3.1), λ_{\max} 343 нм ($\lg \epsilon$ 2.3). МС: m/z , 247 $[M-N_2]^+$, 167 $[M+H-N_2-CF_3]^+$.

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензилбромид (II). К 9 мл 90% азотной кислоты (0.17 моль), не содержащей окислов, охлажденной до -10°C , добавляли по каплям 1.36 г (4.87 ммоль) 4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензилбромида (VII). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при -10°C . Раствор экстрагировали эфиром ($2 \times \times 20$ мл), эфирные вытяжки промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия и водой и сушили над сульфатом натрия. Сульфат натрия отделяли фильтрованием, и фильтрат упаривали на ротаторном испарителе. Полученное желтое масло растворяли в 1 мл системы А и хроматографировали на силикагеле в системе А. Собирали три фракции: (1) – R_f 0.57, (2) – R_f 0.4, (3) – R_f 0.3. Целевой продукт (II) содержался во фракции с R_f 0.4. Выход составил 511 мг (33%). R_f 0.4 (А), 0.13 (Д), МС: m/z , 297 $[M+H-N_2]^+$, 295 $[M-H-N_2]^+$, 251 $[M+H-N_2-NO_2]^+$, 249 $[M-H-N_2-NO_2]^+$. ИК (см^{-1}): 1704 (NO_2), 1608 ($\text{N}=\text{N}$), УФ (этанол): λ_{\max} 251 нм ($\lg \epsilon$ 4.1), 295 нм ($\lg \epsilon$ 3.1), 342 нм ($\lg \epsilon$ 2.2).

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензиламин, гидрохлорид (III). Способ 1. К раствору 170 мг (1.2 ммоль) уротропина в 2 мл хлороформа добавляли 372 мг (1.15 ммоль) соединения (II). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 сут. Выпавший осадок уротропиниевой соли отфильтровывали. Получили 483 мг соли (выход 90%). Соль разлагали 10 мл смеси конц. HCl и метанола (1 : 8) в течение 3 сут при комнатной температуре. Выпавший осадок хлорида аммония отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха. Выход соединения (III) 306 мг (90%).

Способ 2. К раствору 43 мг (0.31 ммоль) уротропина в 1 мл хлороформа добавляли 100 мг (0.31 ммоль) соединения (II). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 сут. Выпавший осадок уротропиниевой соли отфильтровывали. Получили 143 мг (90%) уротропиниевой соли, которую растворяли в 2 мл воды, и пропускали водяной пар в раствор диоксид серы в течение 1.5 ч. Наблюдалось разогревание реакционной смеси и выпадение белого осадка, который отфильтровывали. Образовавшийся 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензиламинметилсульфит (X) суспендировали в 5 мл 25% HCl и пропускали водяной пар в течение 15 мин. Из прозрачного раствора на холоду выпадал белый осадок, его отфильтровывали и промывали ледяной водой (2×2 мл). Выход амина (III) 68 мг (75%). R_f 0.4 (Б). УФ (этанол): λ_{\max} 220 нм ($\lg \epsilon$ 3.74), 260 нм ($\lg \epsilon$ 3.24), 353 нм ($\lg \epsilon$ 2.51).

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензилизотиоцианат (IV). 50 мг (0.17 ммоль)

соединения (III) растворяли в 2.5 мл пиридина, добавляли при перемешивании 100 мкл (1.7 ммоль) сероуглерода. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли 55 мг (0.27 ммоль) DCC. Перемешивали 4 ч, затем смесь упаривали на ротаторном испарителе. Хроматографическое разделение на силикагеле проводили в системе В. Выход соединения (IV) составил 30 мг (58%). R_f 0.7 (Б), 0.9 (В). МС: m/z , 269 $[M-H-S]^+$, 244 $[M-NCS]^+$, 229 $[M-NCS-N]^+$. ИК (см^{-1}): 2080 (NCS), 1704 (NO_2), 1612 ($\text{N}=\text{N}$). УФ (этанол): λ_{\max} 220 нм ($\lg \epsilon$ 3.92), 246 нм ($\lg \epsilon$ 4.06), 353 нм ($\lg \epsilon$ 2.8).

2-Нитро-4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензиламид N^α -Вос-L-аланина (X). N^α -Вос-аланин 8.7 мг (46 мкмоль) растворяли в 1.5 мл хлористого метилена и добавляли 9 мг (67 мкмоль) 1-гидроксисбензотриазола. Реакционную смесь охлаждали льдом, добавляли 11 мг (54 мкмоль) DCC и перемешивали 1 ч. Раствор 16 мг (50 мкмоль) соединения (III) и 20 мкл (54 мкмоль) диизопропилэтиламина в 1 мл хлористого метилена добавляли к реакционной смеси и перемешивали в течение 1 сут. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали. Фильтрат упаривали, остаток растворяли в 10 мл этилацетата, промывали 10% раствором бикарбоната натрия (2×5 мл), 0.1 н. серной кислотой (2×5 мл), водой (2×5 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (2×5 мл). Этилацетатные вытяжки сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали. Выход соединения (X) 10 мг (50%). R_f 0.73 (Г). Наличие свободной аминогруппы доказано нингидриновым тестом после снятия Вос-группы. УФ (этанол): λ_{\max} 319 нм ($\lg \epsilon$ 3.9), 333 нм ($\lg \epsilon$ 2.52), 363 нм ($\lg \epsilon$ 2.2).

Фотолиз 2-нитро-4-[3-(трифторметил)-3H-диазирип-3-ил]бензиламида N^α -Вос-L-аланина (X). Проводили облучение раствора соединения (X) в этаноле (с 1.35 мМ) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. В качестве источника облучения применяли ртутную лампу Mineralight модель UVGL-58 со встроенным фильтром, излучающую монохроматический свет с длиной волны 365 нм, интенсивностью 700 мкВ/см². Необходимую для определения квантового выхода интенсивность падающего света, выраженную в единицах квант/с, определяли с помощью актинометрии ферриоксалат-фенантролиновым методом [30]. Интенсивность (I_0) составила величину 1.5×10^{16} квант/с. Раствор после 75 мин облучения анализировали с помощью ТСХ на силикагеле. В растворе был обнаружен амид N^α -Вос-аланина (R_f 0.38 в системе хлороформ-метанол (9 : 1)), по подвижности совпадающий с реперным соединением. При опрыскивании пластинки 0.2% раствором нингидрина в ацетоне, содержащим 10% уксусной кислоты, с последующим нагреванием до

100°C появляется характерное для аминокислот фиолетовое окрашивание.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований.

Авторы приносят благодарность к.х.н. В.Л. Друце за предоставленное оборудование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh A., Thornton E.R., Westheimer F.H. // *J. Biol. Chem.* 1962. V. 23. P. 3006–3008.
2. Bayley H. // *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology* / Eds T. Work, R. Burdon. Amsterdam: Elsevier, 1983. V. 12. P. 187.
3. Brunner J. // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 483–514.
4. Kotzyba-Hilbert F., Kapfer I., Goedner M. // *Angew. Chem., Int. Ed.* 1995. V. 34. P. 1296–1312.
5. Brunner J., Richards F. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 225. P. 3319–3329.
6. Когон А.А. Новые фотоактивируемые реагенты для исследования биологических макромолекул методом быстрых фотоаффинных сшивок. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1990.
7. Savage M.D., Mattson G., Desai S., Nielander G.W., Morgensen S., Conklin E.J. *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*; Illinois: Pierce Chemical Co., 1992.
8. Kogon A., Peletskaya E., Quinn T., Folk W. // *Book of Abstracts. 37th Annual West Central States Biochemistry and Molecular Biology Conference, Research and Education. University of Missouri-Columbia, 1994.* P. 60.
9. Brunner J. // *Trends in Cell Biol.* 1996. V. 6. P. 154–157.
10. Bochkarev D., Kogon A. // *Anal. Biochem.* 1992. V. 204. P. 90–95.
11. Kogon A., Bochkarev D., Baskunov B., Cherpakov A. // *Liebigs Ann. Chem.* 1992. P. 879–881.
12. Kempin U., Kanoaka Y., Hatanaka Y. // *Heterocycles.* 1998. V. 49. P. 465–468.
13. Fang K., Hashimoto M., Jokush S., Turro N.J., Nakanishi K. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 8543–8544.
14. Pillai K. // *Synthesis.* 1980. P. 1–26.
15. Lloyd-Williams F. // *Tetrahedron.* 1993. V. 49. P. 11065–11133.
16. Olejnik J., Krzymanska-Olejnik E., Rothschild K.J. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3572–3576.
17. Wei Y., Yan Y., Pei D., Gong B. // *Bioorg. Med. Chem. Letters.* 1998. V. 8. P. 2419–2422.
18. Olejnik J., Ludemann H.-C., Krzymanska-Olejnik E., Berkenkamp S., Hillenkamp F., Rothschild K.J. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 4626–4631.
19. Nassal M. // *Liebigs Ann. Chem.* 1983. P. 1510–1523.
20. Nassal M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 7540–7545.
21. Топин А.Н. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 1995. Т. 36. С. 583–587.
22. Delepine M. // *Compt. Rend.* 1895. V. 120. P. 501.
23. Тумце Л., Айхер Т. *Препаративная органическая химия: Пер. с нем.* М.: Мир, 1999.
24. Анжуал С.Дж. // *Органические реакции.* М.: ИЛ, 1965. Сб. 8. С. 263.
25. Houben-Weyl // 1957. Bd. XI. 1. S. 106.
26. Brunner J., Semenza G. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 7174–7182.
27. Dolder M., Michel H., Sigrist H. // *J. Prot. Chem.* 1990. V. 9. P. 407–415.
28. Wieboldt R., Ramesh D., Carpenter B.K., Hess G.P. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 1526–1533.
29. Brunner J., Senn H., Richards F.M. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 3313–3318.
30. Экспериментальные методы химической кинетики / Ред. Н.М. Эмануэль, Г.Б. Сергеев. М.: Высшая школа, 1980. С. 132–135.

New Photoreactive Cleavable Reagents with Trifluoromethyldiazirine Group

M. T. Mchedlidze^{*,#}, N. V. Sumbatyan^{*},
D. A. Bondar^{*}, M. V. Taranenko^{*}, and G. A. Korshunova^{**}

[#] Phone: +7 (095) 939-5520; e-mail: manana_m@mail.ru

^{*} Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

^{**} Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Photoreactive cross-linking reagents that simultaneously contain a trifluoromethyldiazirine and an *o*-nitrobenzyl groups were synthesized for the first time. Photochemical properties of the reagents were studied, and the possibility of separate activation of the diazirine group and *o*-nitrobenzyl linker was shown. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: trifluoromethyldiazirines, cleavable photoreactive reagents, photolysis