

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

**ТОПОЛЬЯН АРТЁМ ПАВЛОВИЧ**

**СТАБИЛЬНЫЕ КАРБОКАТИОНЫ КАК МАСС-  
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТКИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ  
БИОМОЛЕКУЛ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Лаборатории органического синтеза **Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)**

Научный руководитель:

**Формановский Андрей Альфредович**, доктор химических наук.

Официальные оппоненты:

**Доценко Виктор Викторович**, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии и технологий Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Кубанский государственный университет».

**Зацепин Тимофей Сергеевич**, кандидат химических наук, доцент, Центр биомедицинских исследований Автономной некоммерческой образовательной организации высшего профессионального образования «Сколковский институт науки и технологий».

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «**Российский университет дружбы народов**»

Защита состоится 28 июня 2017 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)

Автореферат разослан \_\_\_\_ \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Масс-спектрометрия (МС) в настоящее время служит мощным методом анализа и исследования веществ. Развитие методологии, инструментальной базы и способов обработки данных предоставляет исследователям новые возможности. Расширяются известные и появляются новые области применения МС. Появившиеся методы с «мягкой» ионизацией, ионизация электрораспылением (ИЭР), химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД) и масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI), значительно расширили границы масс-спектрометрического анализа различных классов соединений. Главный недостаток этих методов заключается в низкой эффективности ионизации (или десорбции/ионизации в случае MALDI) соединений, неспособных к легкому присоединению протона, катиона или депротонированию. Еще одна распространенная проблема – зашумленность низкомолекулярной области спектра в результате ионизации и последующих ионно-молекулярных реакций растворителей (ИЭР, ХИАД) или матричных соединений (MALDI), что существенно осложняет детекцию и идентификацию аналитов с низкими молекулярными массами. Наиболее часто используемый подход к решению этих проблем заключается в применении дериватизации с введением в анализируемую молекулу связанного заряда или фрагмента с легко ионизирующейся группой. Масса наблюдаемого иона при этом увеличивается на соответствующий введенной в результате дериватизации группы инкремент, а эффективность ионизации получаемого производного, обусловленная наличием ионогенного фрагмента, существенно выше, чем у исходного соединения. Несмотря на то, что современный уровень развития приборной базы позволяет произвести огромное число различных исследований с высокой чувствительностью, стоит отметить, что зачастую такие эксперименты требуют дорогостоящего оборудования и квалифицированных экспериментаторов.

В этой связи актуальной является задача синтеза новых дериватирующих реагентов (как отщепляемых, так и неотщепляемых масс-спектрометрических меток) и создания на их основе простых, экспрессных и чувствительных методов анализа широкого круга органических веществ и биомолекул.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы был синтез новых масс-спектрометрических меток, исследование их химических и масс-спектрометрических свойств и возможности применения для различных прикладных аналитических задач.

В процессе данной работы были поставлены следующие экспериментальные **задачи**:

1. Разработать методологию для синтеза масс-спектрометрических меток на основе тритильного катиона, исследовать масс-спектрометрические свойства таких меток и показать возможности их применения.

2. Обобщить методики синтеза трифенилциклопропенилиевого карбокатиона и предложить метод синтеза масс-спектрометрических меток на его основе. Исследовать масс-спектрометрические свойства полученных соединений и показать применение полученной метки для детекции аминов.

3. Синтезировать гексафторфосфаты трис(2,4,6-триметоксифенил)метилия и трис(2,6-диметоксифенил)метилия. Изучить их масс-спектрометрические свойства и возможности использования как неотщепляемой масс-спектрометрической метки для детекции аминсодержащих и тиолсодержащих биологически активных соединений. Показать возможности дериватизации для доказательства наличия аминогруппы в образце нового антибиотика.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Разработан новый универсальный реагент для синтеза библиотек масс-спектрометрических меток и на его основе предложен метод кодирования информации на полимерных поверхностях и дендримерах. Исследованы масс-спектрометрические свойства производных трифенилметильного катиона, модифицированных тиолами. Обобщены и систематизированы методы синтеза тетрахлорциклопропена, диарилацетиленов, триарилциклопропиенилиевых карбокатионов. Изучена зависимость интенсивности масс-спектрометрических пиков триарилциклопропенилиевых карбокатионов от структуры арильного заместителя. На основе трифенилциклопропенилиевого карбокатиона синтезирован ряд *C*-, *N*- и *S*-производных и исследованы их масс-спектрометрические свойства. Для 6-трифенилциклопропенилтиогексановой кислоты и её активированного эфира определены пределы детекции методами (MA)LDI-MS и ионизацией электрораспылением. Изучена возможность использования гексафторфосфатов трис(2,4,6-триметоксифенил)метилиевого и трис(2,6-диметоксифенил)метилиевого карбокатионов для анализа смеси первичных и вторичных аминов и дифференциации изомерных первичных и вторичных аминов. Предложен новый метод дериватизации аминов трис(2,6-диметоксифенил)метилем. В качестве объектов модификации были протестированы алифатические и ароматические амины, стерически затрудненные амины, аминокислоты, пептиды, гормоны, лекарственные препараты, фосфатидилэтаноламины, аминогликозидные антибиотики. Предложенный метод использовался для подтверждения наличия первичной аминогруппы в молекуле антибиотического комплекса ИНА-5812. Взаимодействием трис(2,6-диметоксифенил)метилия с *N*-(аминоэтил)малеимидом был получен дериватирующий реагент тиольной группы, был исследован широкий круг тиолов и их смесей, а также тиолсодержащих лекарственных препаратов.

**Апробация работы и публикации.** Результаты данной работы представлены на XXIV Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2012), VIII Всероссийской конференции с международным участием «Менделеев-2014» (Санкт-Петербург, 2014), V Международной научной конференции «Химия,

структура и функция биомолекул» (Минск, 2014), 62-ой конференции Американского масс-спектрометрического общества (Балтимор, США, 2014), VII Всероссийском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), международной конференции «Химическая биология» (Новосибирск, 2016), 2-ой международной конференции «Инновации в масс-спектрометрии: приборы и методы» (Москва, 2016). По материалам диссертации опубликовано **13** печатных работ, из них **4** статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

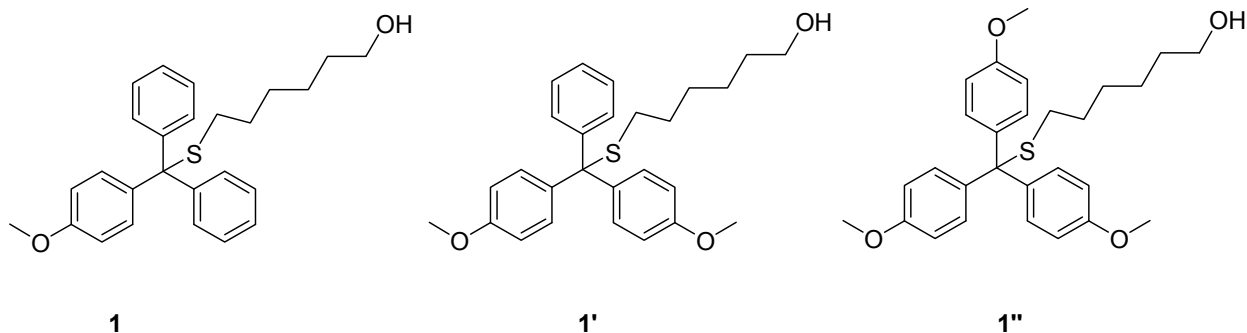
**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 218 машинописных страницах, состоит из введения, частей "Литературный обзор", "Обсуждение результатов", "Экспериментальная часть", выводов, библиографического списка, состоящего из 483 источников, из которых 472 – на иностранном языке, приложения. Работа включает 82 рисунка, 4 схемы и 6 таблиц.

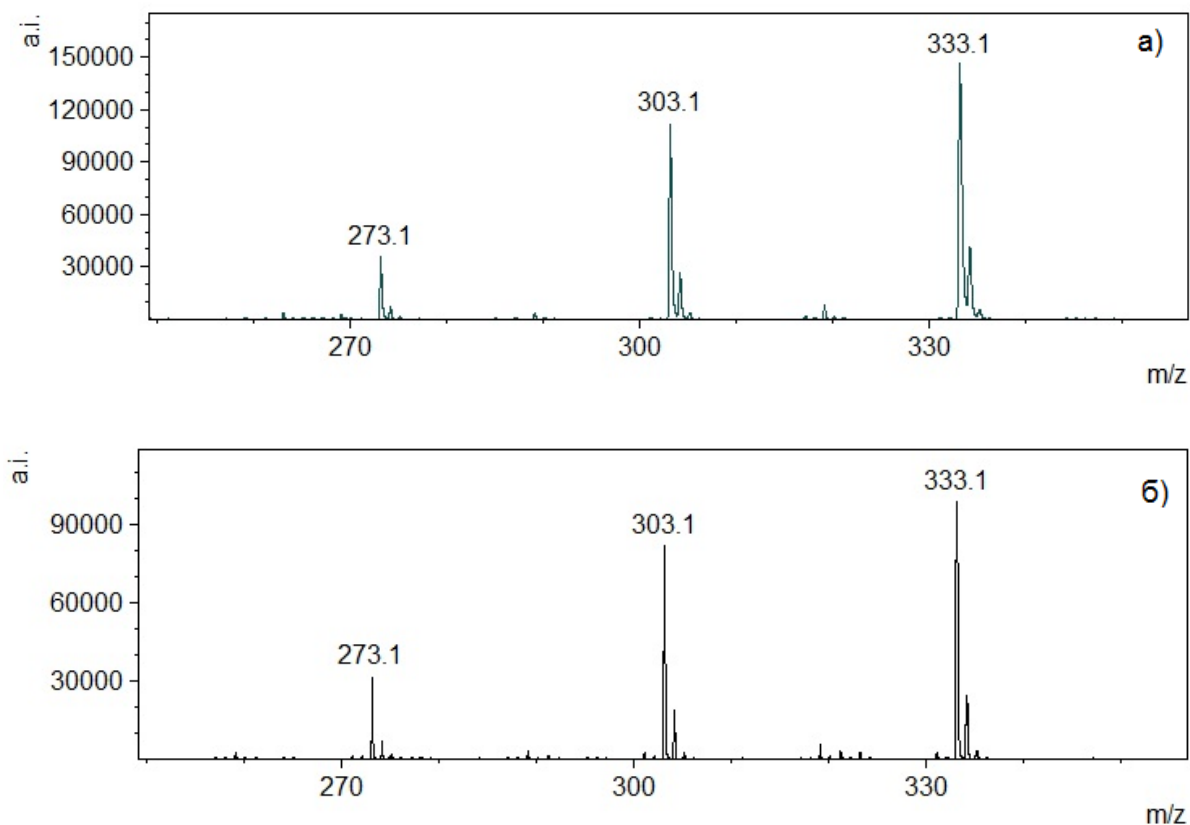
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1 Отщепляемые масс-спектрометрические метки

#### 1.1 Отщепляемые масс-спектрометрические метки на основе трифенилметильного карбокатиона

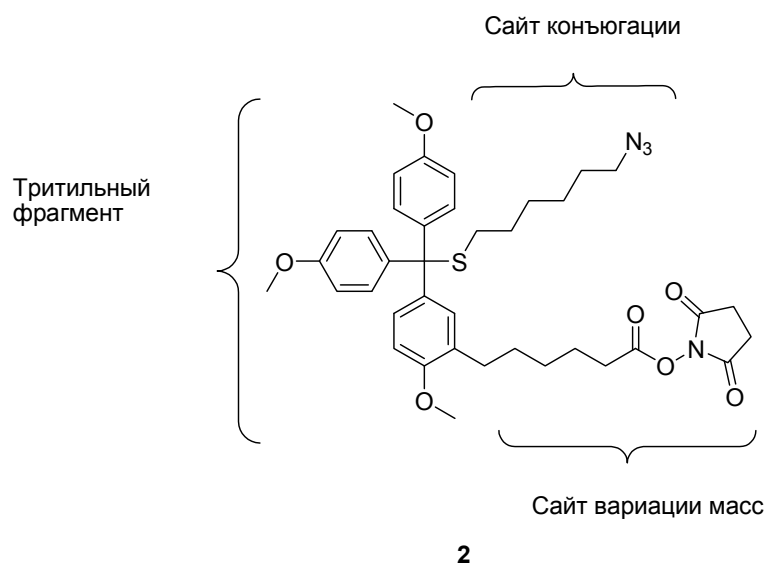
Масс-спектрометрическая метка – это прежде всего легко ионизируемая молекула, поэтому при выборе модельного субстрата мы отталкивались от того, что в её структуре центральное место должен занимать карбокатион. Наиболее простым и распространенным для этих целей субстратом служит трифенилметильный (триметильный) катион. Было показано (в том числе ранее в нашей лаборатории), что интенсивность сигнала катиона в масс-спектре коррелирует с увеличением стабильности карбокатиона и находится в обратной зависимости от химической стабильности соединений, содержащих катион. Учитывая крайне низкую стабильность соединений, в которых триметильный катион связан с остальной частью молекулы через атом кислорода, в настоящей работе мы предложили заметить кислород на атом серы. Были синтезированы исходные моно-, ди-, три-метоксифенилметилмеркаптогексанола



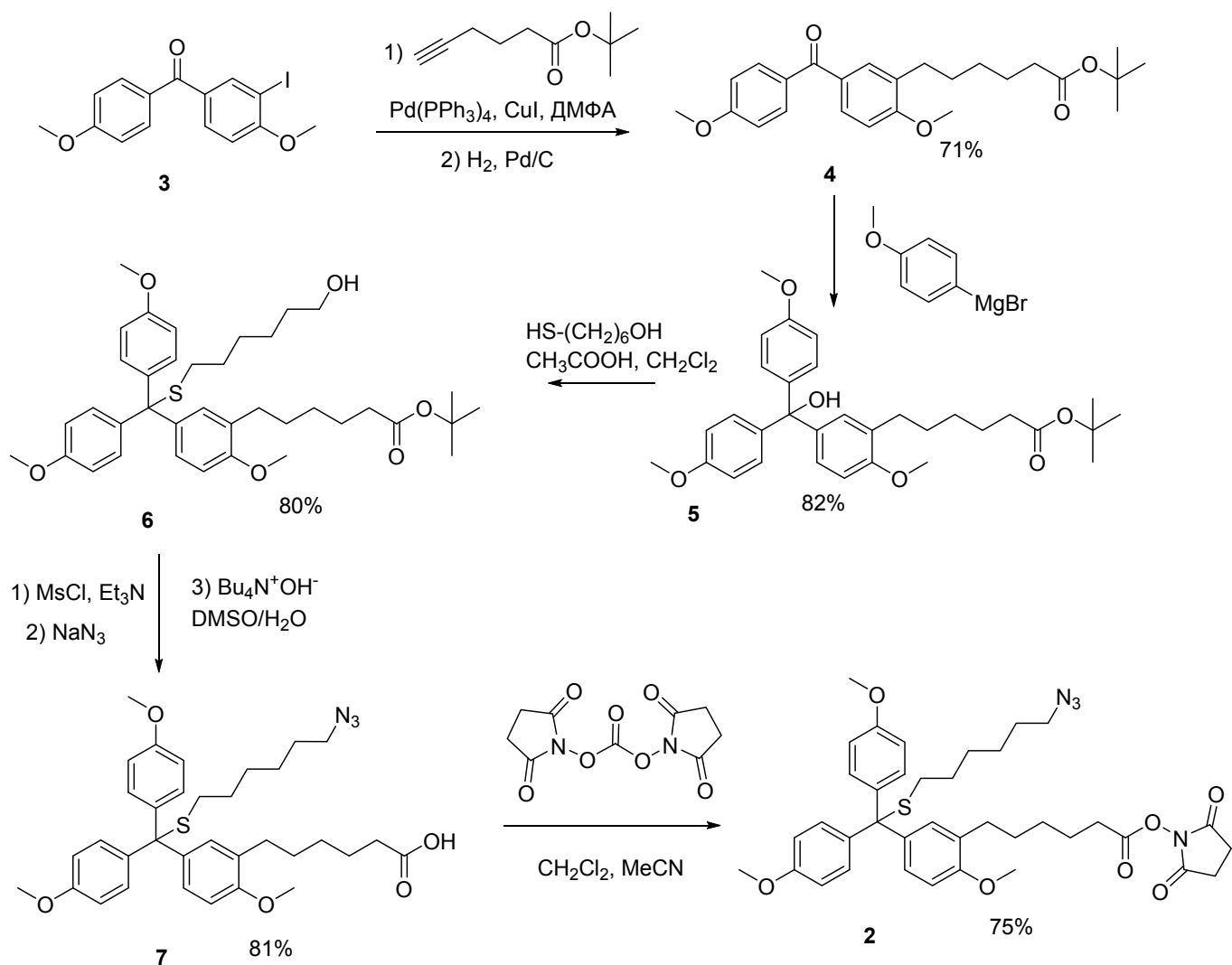


**Рис. 1.** Спектр MALDI-МС эквимольной смеси соединений **1**, **1'**, **1''** (матрица – синапиновая кислота) (а). Спектр LDI-МС эквимольной смеси соединений **1**, **1'**, **1''** (б).

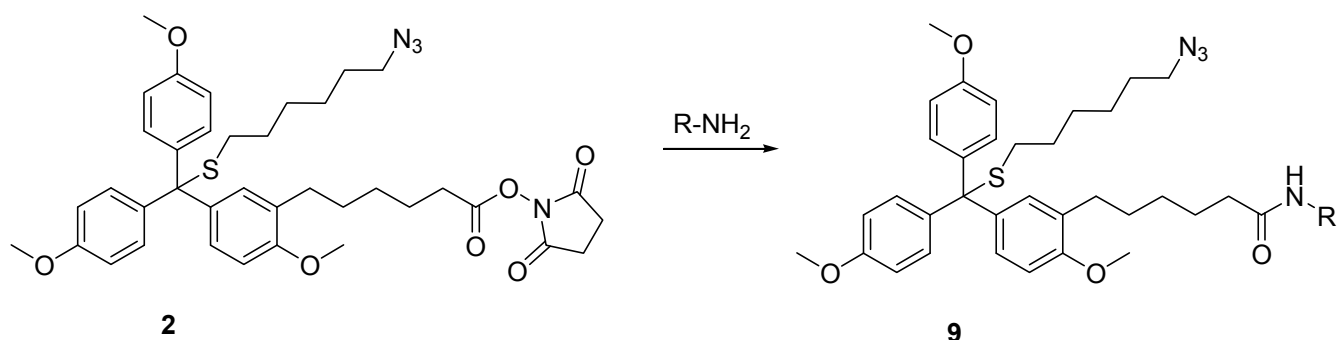
В спектрах MALDI/LDI-МС четко прослеживается увеличение интенсивности сигнала карбокатиона с увеличением его стабильности (рис.1). Мы предложили модельное соединение **2**, содержащее в своей структуре три основных фрагмента: собственно триметокситритильный катион, сайт конъюгации, связанный лабильной связью через атом серы с центральным углеродным атомом и остаток *N*-гидрокси-сукцинимидного эфира, выполняющий роль сайта вариации масс, присоединенный к 3-му атому углерода одного из фенильных колец.



Для синтеза реагента **2** нами была разработана и успешно реализована следующая схема:

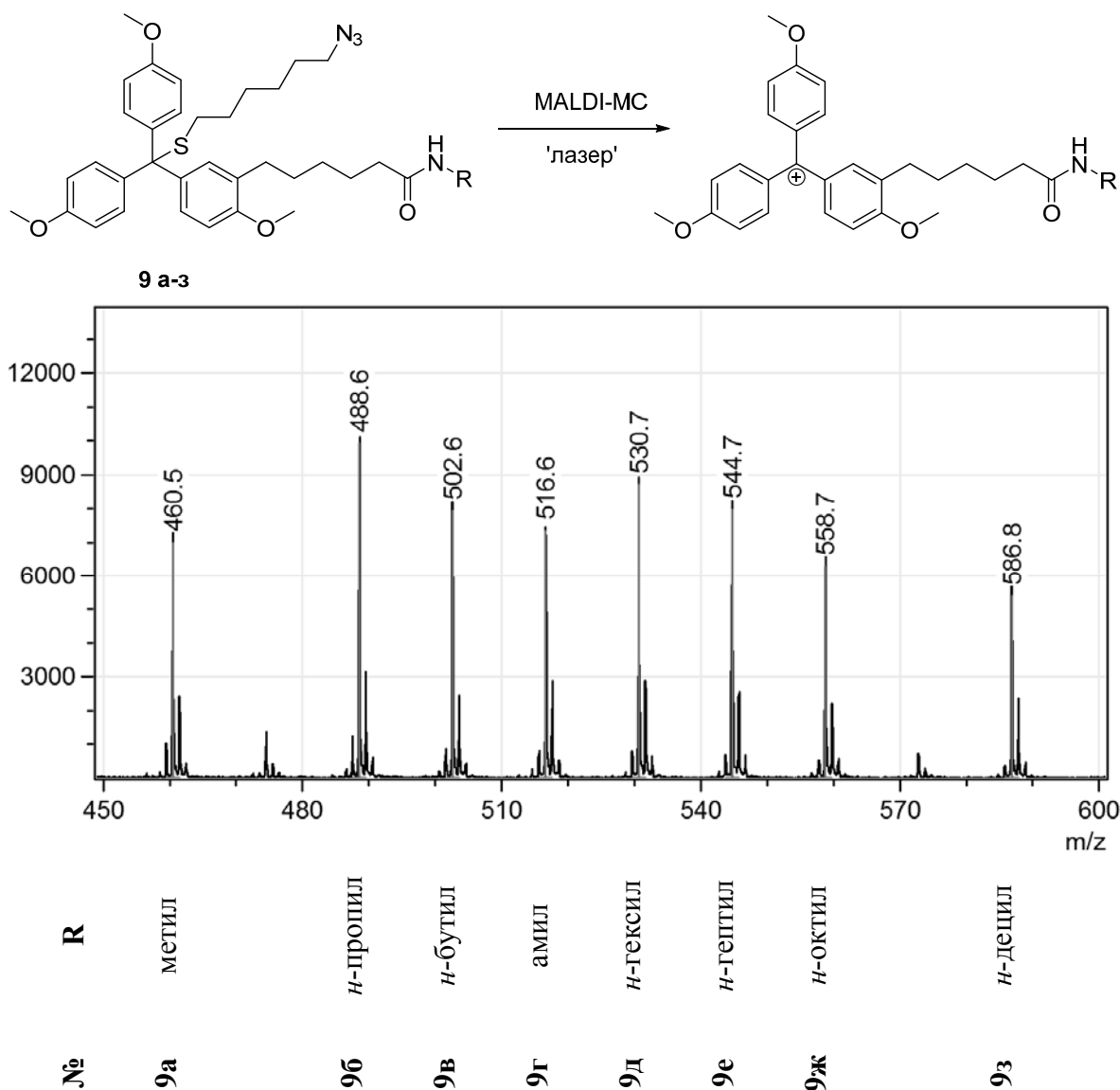


Используя методы комбинаторной химии, из соединения **2** и соответствующих аминов мы можем получать библиотеки масс-спектрометрических меток:



R = -CH<sub>3</sub> (**а**), *n*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (**б**), *n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (**в**), *n*-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (**г**), *n*-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub> (**д**), *n*-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub> (**е**), *n*-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> (**ж**), *n*-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> (**з**).

Амиды **9б** и **9г** были выделены и охарактеризованы для подтверждения структуры. В остальных экспериментах амиды **9** использовались без дополнительной очистки. Эквимольная смесь амидов **9 а-з** была проанализирована методом MALDI-МС (рис. 2).



**Рис. 2.** Спектр MALDI-МС эквимольной смеси амидов **9а-з**.

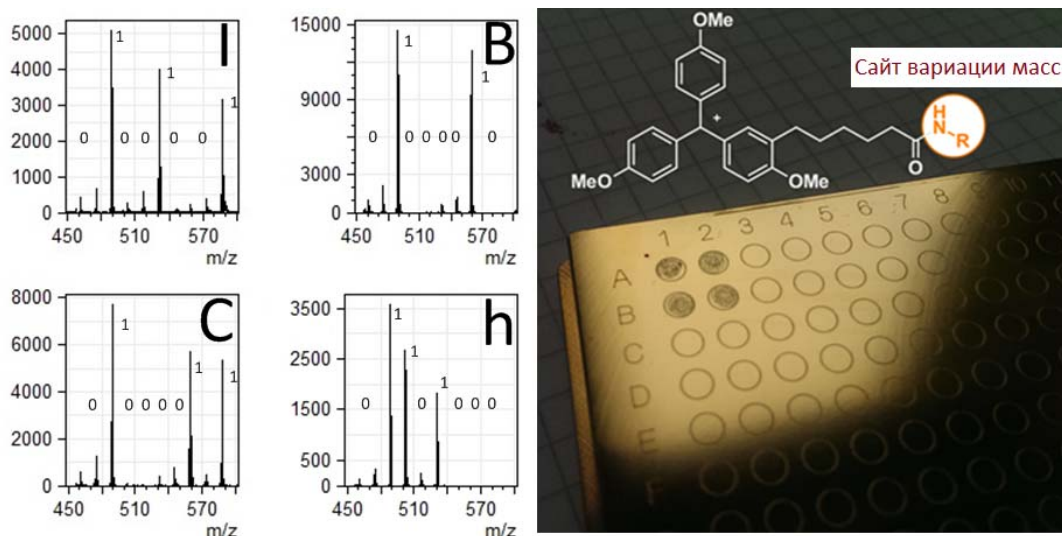
Из рисунка 2 видно, что интенсивности пиков сопоставимы, а размер алкильного радикала незначительно влияет на ионизационную способность масс-спектрометрических меток. Мы предлагаем оригинальное использование библиотеки масс-спектрометрических меток для двоичного кодирования информации на основе таблицы ASCII (American standard code for information interchange), в которой каждому символу соответствует некий числовой код. Если эти символы представить в двоичной системе счисления, то получится восьмизначный код, состоящий из единиц и нулей (табл. 1). В качестве примера можно привести аббревиатуру ИБХ – буквы «I», «B», «C», «h».

**Таблица 1.** Соответствие букв латинского алфавита, кода ASCII и двоичного кода.

Буква	Код ASCII	Двоичный код
I	73	01001001
B	66	01000010
C	67	01000011
h	104	01101000



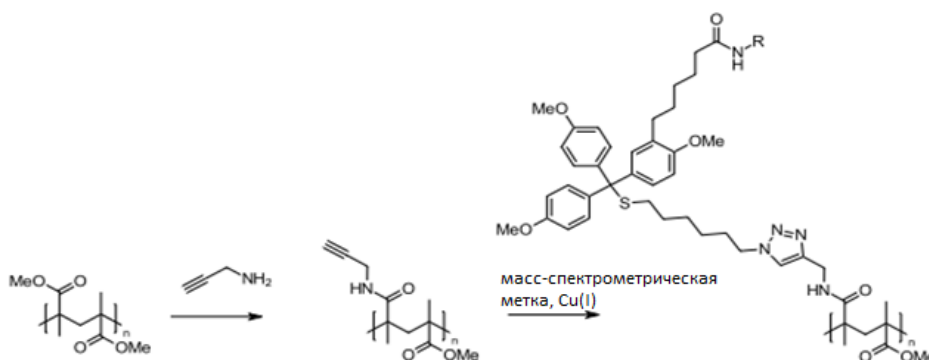
Каждому положению в двоичном коде будет соответствовать одна масс-спектрометрическая метка (рис. 2). Если в определенном положении стоит единица – это значит, что сигнал масс-метки есть, если ноль – соответствующий сигнал отсутствует. Смешивая эквимольные концентрации соответствующих амидов и анализируя их методом MALDI-МС, получили четыре масс-спектра, каждый из которых кодирует определенную букву (рис. 3).



**Рис. 3.** Масс-спектры MALDI-МС смесей масс-спектрометрических меток, соответствующих буквам «I», «B», «C», «h».

Таким образом, мы показали возможность кодирования любой информации с использованием описанного подхода, что может иметь самое разнообразное применение от контроля качества товаров до решения криптографических задач.

В следующем эксперименте мы показали возможность ковалентного связывания масс-спектрометрической метки с полимерной поверхностью (рис. 4).



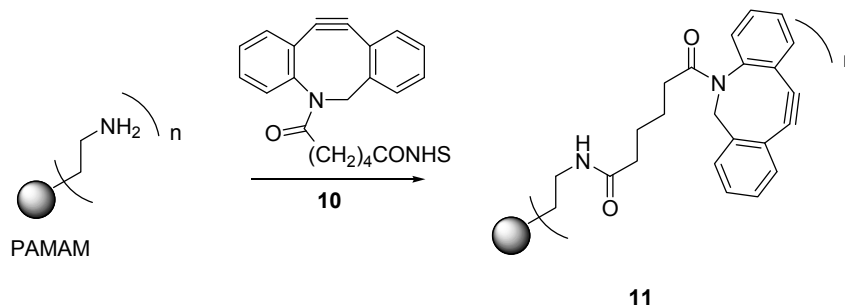
**Рис. 4.** Схема связывания масс-спектрометрической метки с алкинмодифицированным ПММА.

Полиметилметакрилат (ПММА) был модифицирован пропаргиламином и нанесен на поверхность мишени масс-спектрометра. Эту поверхность обработали раствором, содержащим масс-спектрометрическую метку **9г** и медный катализатор. При этом азидогруппа метки легко вступает в азид-алкиновое циклоприсоединение с терминальными ацетиленовыми группами

(реакция Хьюсена), находящимися на поверхности пленки. Анализ полученной поверхности методом LDI показал, что в масс-спектре четко виден сигнал метки ( $m/z$  516). Для исключения возможности нековалентного связывания метки и поверхности были проведены два контрольных эксперимента: 1) тем же раствором обработали поверхность мишени, покрытой пленкой немодифицированного ПММА, 2) поверхность мишени, покрытую алкинмодифицированным ПММА, обработали раствором метки **9г**, не содержащем медный катализатор.

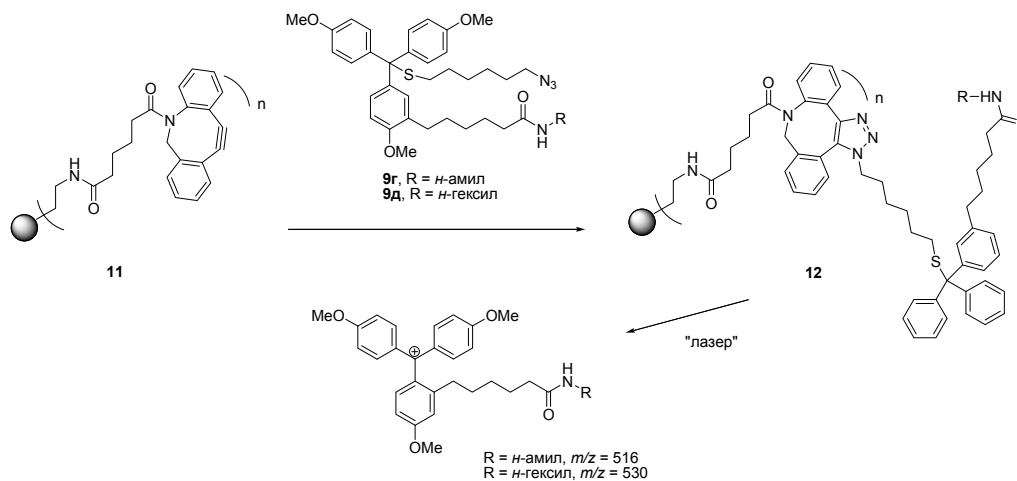
В следующей серии экспериментов мы показали возможность дериватизации циклооктинмодифицированного ПАМАМ-дендримера (полиамидамина) масс-спектрометрическими метками с помощью «безмедной» реакции [3+2]-циклоприсоединения и последующим определением меток методом MALDI-МС.

Модификация ПАМАМ-дендримера *N*-оксисукцинимидным эфиром 6-(11,12-дидегидродibenzo[b,f]азоцин-5(6*H*))ил)-6-оксогексановой кислоты **10** позволяет получать дендример **11**, содержащий стабилизированный циклооктиновый фрагмент (рис. 5).



**Рис. 5.** Реакция модификации ПАМАМ-дендримера активированным эфиром **10**

Предварительно полученные амиды **9г** и **9д** были введены в реакцию с соединением **11**, и образовавшийся конъюгат **12** проанализировали методом (МА)LDI-МС (рис. 6). Спектр LDI-МС конъюгата **12** содержит четкие, интенсивные пики тритильных катионов (остатков масс-спектрометрических меток) с соответствующими  $m/z$  (516 для катиона с *n*-амильным радикалом, 530 для катиона с *n*-гексильным радикалом).



**Рис. 6.** Дериватизация соединения **11** масс-спектрометрическими метками **9г** и **9д**.

Для исключения нековалентного связывания метки с модифицированным РАММ-дендримером **11** он был обработан избытком бензилазида, выделен, обработан масс-спектрометрической меткой **9в**, снова осажден и проанализирован масс-спектрометрически. Как и ожидалось, в масс-спектре не было сигналов, соответствующих метке **9в** (рис. 7).

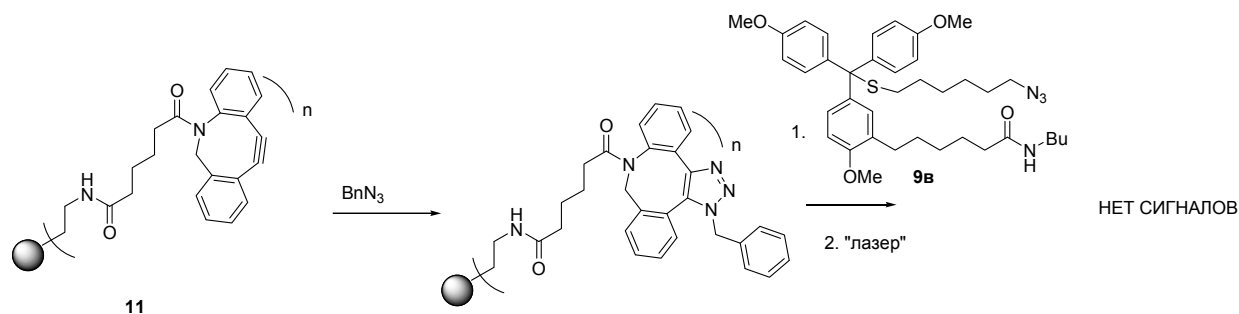


Рис. 7. Схема контрольного эксперимента.

Еще одной удобной моделью триарилметильного катиона служит пиксильный катион, коммерчески доступный в виде 9-фенил-9*H*-ксантен-9-ола **12**. Мы предложили двухстадийный способ получения из спирта **12** азида **13**, в котором пиксильный фрагмент соединен с реакционноспособной азидогруппой через тиогексильный фрагмент. Для демонстрации возможностей метода мы провели реакцию Хьюсгена азида **13** с трет-бутиловым эфиром гексин-5-овой кислоты, в результате которой с хорошим выходом было получено вещество **14**, масс-спектр которого содержит четкий пик ( $m/z$  257), соответствующий пиксильному катиону (рис. 8).

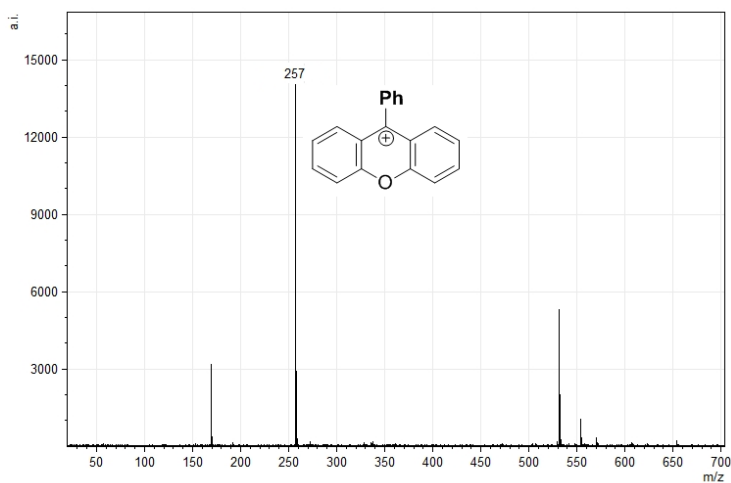
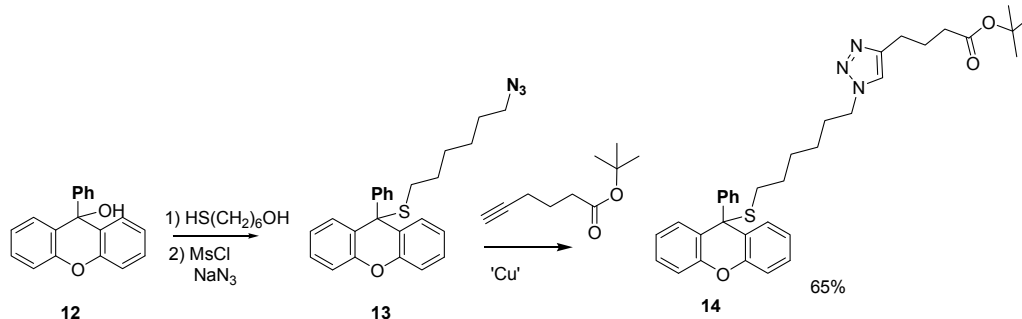
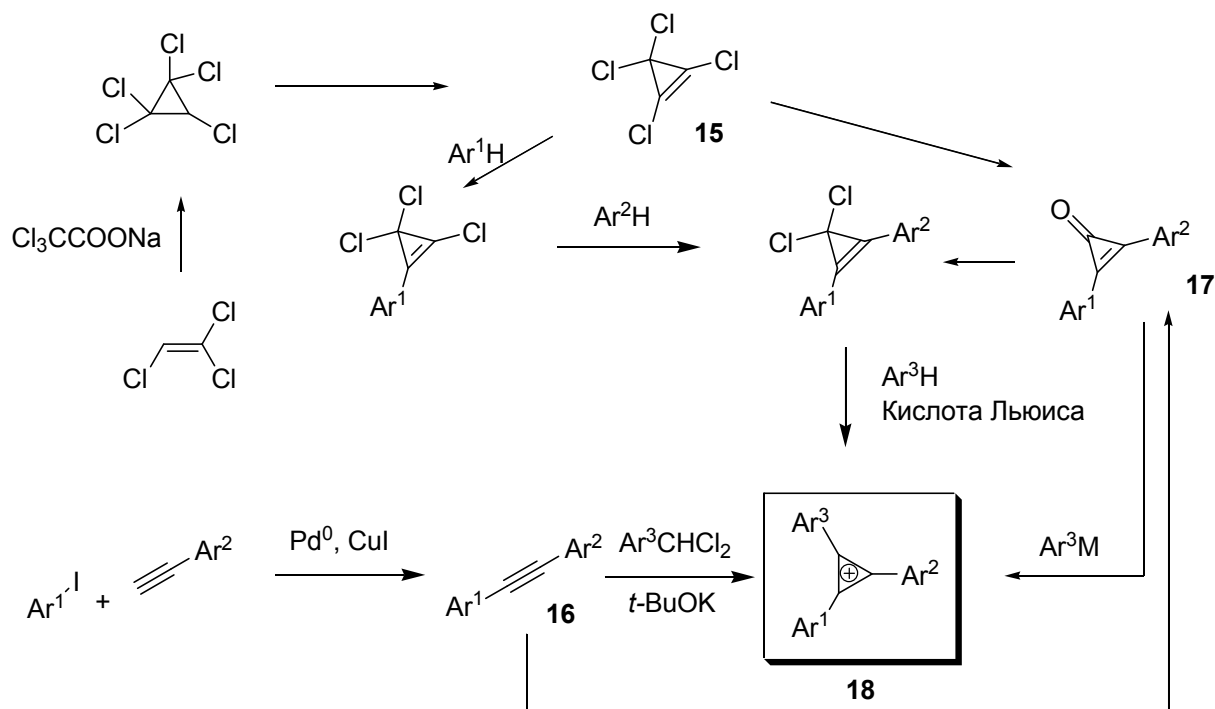


Рис. 8. Схема синтеза соединения и масс-спектр LDI-МС соединения **14**.

## 1.2 Отщепляемые масс-спектрометрические метки на основе трифенилциклопропенилиевого карбокатиона

Следующей сопряженной ароматической системой, на основе которой могут быть синтезированы отщепляемые масс-спектрометрические метки, является трифенилциклопропенилиевый карбокатион. Основные подходы к синтезу триарилциклопропенилиевого катиона представлены на рисунке 9.

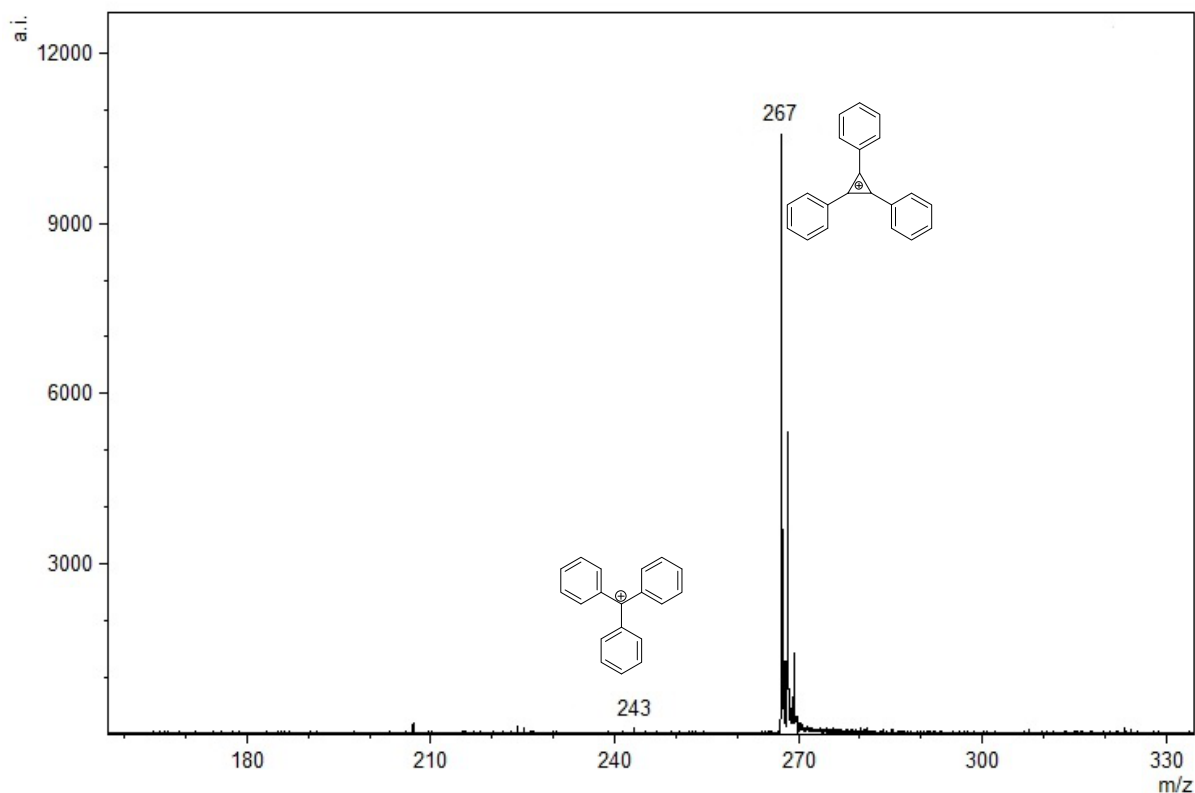


**Рис. 9.** Основные пути синтеза триарилциклопропенилиевого катиона.

Важным прекурсором для синтеза триарилциклопропенилиевого катиона служит тетрахлорциклопропен **15**, который был получен двухстадийным синтезом из доступного трихлорэтилена. Тетрахлорциклопропен является удобным электрофильным реагентом и легко вступает в реакцию Фриделя-Крафтса как напрямую с образованием триарилциклопропенилиевого катиона, так и через промежуточный субстрат диарилциклопропенон (рис. 9). Другой подход к синтезу триарилциклопропенилиевого катиона заключается в получении ряда диарилацетиленов. Мы оптимизировали различные методики палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания (реакции Соногаширы) для синтеза симметричных и несимметричных диарилацетиленов **16**. Полученные диарилацетилены, как и тетрахлорциклопропен, могут быть использованы для синтеза диарилциклопропенон **17** (рис. 9). Далее, действуя на полученные арилзамещенные циклопропенильные кетоны реактивом Грирьяра, литийорганическими соединениями или путем реакции Фриделя-Крафтса можно получать триарилциклопропенилиевые катионы **18** (рис. 9). Однако, на наш взгляд, наиболее удобным

является прямой метод синтеза триарилциклопропенилиевого катиона из диарилацетиленов **16** (рис 9).

Ароматический трифенилциклопропенилиевый катион намного стабильнее соответствующего тритильного катиона ( $pK_{R^+}$  3.1 и -6.6 соответственно). Этот факт находит и масс-спектрометрическое подтверждение: даже при соотношении концентраций  $Tr^+$  и  $C_3Ph_3^+$  (5:1), удается зарегистрировать едва заметный его сигнал (рис 10).

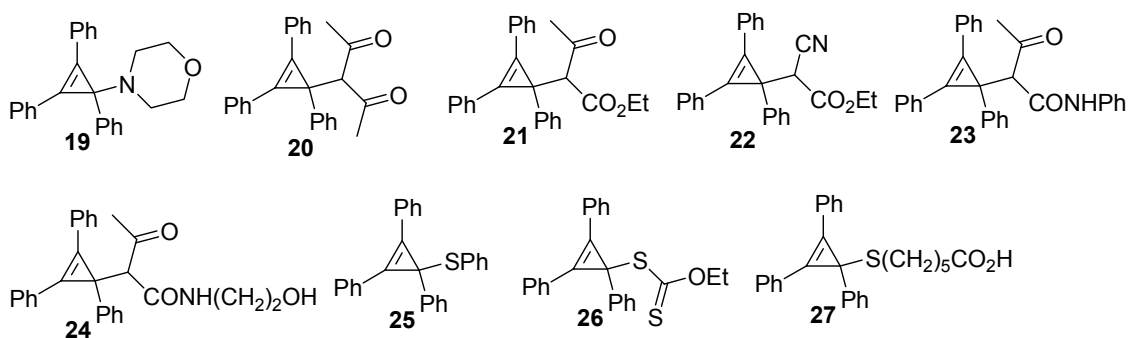


**Рис. 10.** Сравнение интенсивностей  $Tr^+$  ( $2 \cdot 10^{-2}$  M) и  $C_3Ph_3^+$  ( $4 \cdot 10^{-3}$  M) при одновременном присутствии в образце (в спектре, зарегистрированном методом LDI-MS).

Также мы показали, что, как и для производных тритильного катиона, увеличение числа донорных заместителей в ароматических кольцах ведет к увеличению стабильности триарилциклопропенилиевого катиона и, как следствие, усилению интенсивности сигнала в масс-спектре.

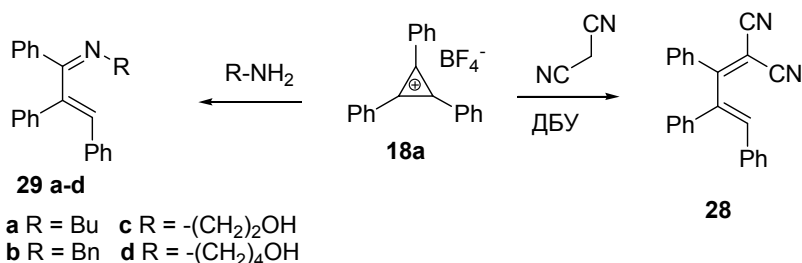
Для соединения **18a** ( $C_3Ph_3^+ \cdot BF_4^-$ ) был определен нижний предел детекции методом MALDI ( $1 \cdot 10^{-11}$  моль в ячейке мишени масс-спектрометра) и методом LDI ( $1 \cdot 10^{-9}$  моль в ячейке мишени масс-спектрометра).

Для исследования ионизации ковалентных производных трифенилциклопропенилиевого катиона мы синтезировали ряд соединений *C*-, *N*- и *S*-связанных трифенилциклопропен-3-ильных производных **19–27** (рис. 11).



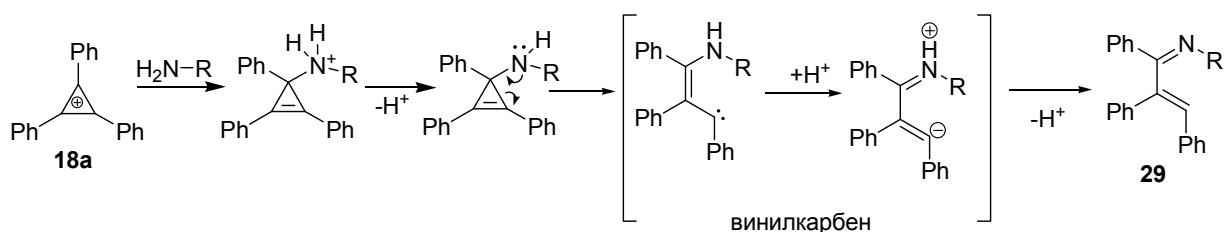
**Рис. 11.** Синтезированные производные трифенилциклопропенилиевого катиона.

Интересные результаты мы получили при попытке использовать в качестве нуклеофилов анион малонитрила и первичные амины: в этих реакциях наблюдается раскрытие трехчленного цикла с образованием соединений **28** и **29 a-d** (рис. 12). Строение этих соединений доказано методами двумерной ЯМР-спектроскопии.



**Рис. 12.** Взаимодействие трифенилциклопропенилиевого катиона с малонитрилом и первичными аминами.

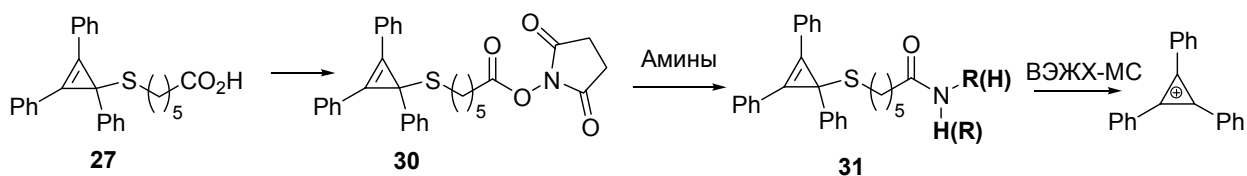
Мы предполагаем, что в нашем случае перегруппировки реализуются через винил-карбениевый механизм (рис. 13).



**Рис. 13.** Предполагаемый механизм винил-карбениевой перегруппировки.

Анализ масс-спектров синтезированных *C*-, *N*- и *S*-связанных трифенилциклопропенилиевых производных показал, что наиболее подходящими субстратами для использования в качестве отщепляемой масс-спектрометрической метки служат соединения, в которых катион связан с атомом серы.

Для проведения дальнейшей функционализации кислоты **27** был получен ее активированный эфир **30**, который легко реагирует с аммиаком, первичными и вторичными аминами, а полученные амиды претерпевают гетеролитический разрыв по связи C-S в условиях ионизации электрораспылением (рис. 14).



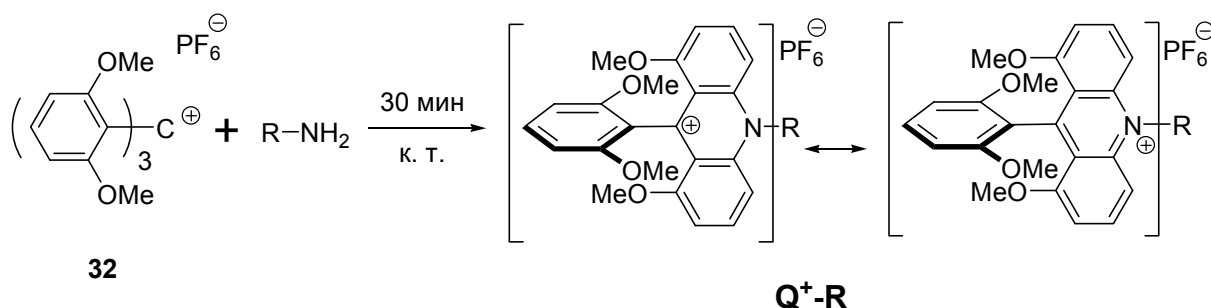
**Рис. 14.** Синтез активированного эфира **30** и дериватизация им аминов.

Предел детекции соединения **30** методом ВЭЖХ-МС составил 30 амоль (объем пробы - 2 мкл  $1.67 \cdot 10^{-11}$  М раствора). Полученную масс-спектрометрическую метку **30** мы предлагаем использовать для детекции низкомолекулярных и летучих аминов. Реакция между активированным эфиром **30** и аминами проходит быстро и в мягких условиях, с полной конверсией исходного субстрата в соответствующий амид **31**. В результате тестирования смесей амидов **31** в различных соотношениях было установлено, что присутствующие концентрации (3:1 и 10:1) прямо коррелируют с соотношением площадей пиков хроматомасс-спектра. Но эта корреляция ухудшается при переходе к соотношению концентраций соединений 100:1, поэтому мы не рекомендуем при количественном анализе аминов предлагаемым методом использовать концентрацию внутреннего стандарта более чем на порядок отличающуюся от концентрации аналита. Также в работе описан метод количественного анализа смесей аминов, пирролидина и пентиламина, с использованием избытка реагента **30**, с последующим «гашением» избытка соединения **30** 4-аминобутанолом. Добавление в качестве внутреннего стандарта амида **31** (дециламин) позволяет установить порядок концентраций аминов в исходной смеси.

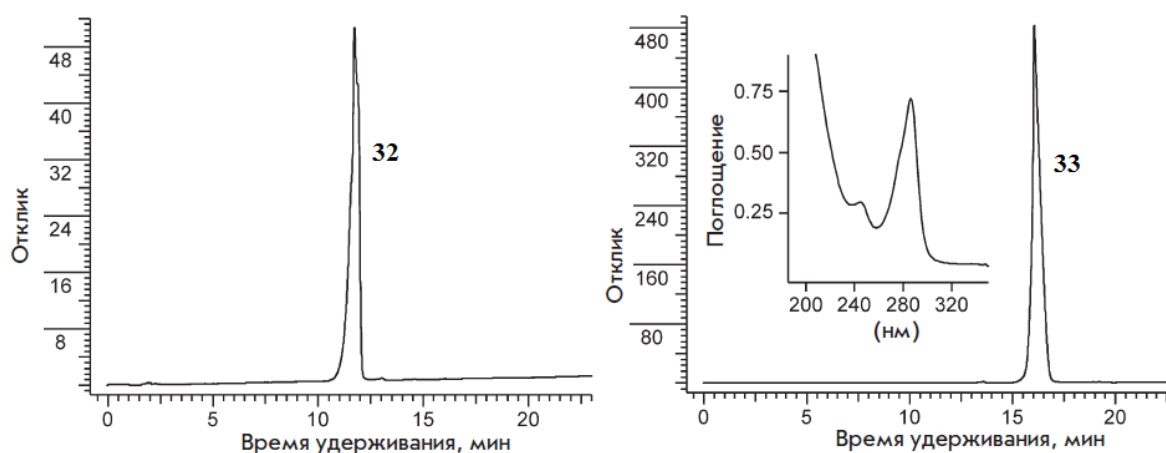
## 2 Неотщепляемые масс-спектометрические метки

### 2.1 Неотщепляемые масс-спектрометрические метки на основе трис(2,6-диметоксифенил)-метильного катиона

Другой тип масс-спектрометрических меток представляют неотщепляемые масс-спектрометрические метки, которые ковалентно связываются с молекулами аналита и детектируются вместе с ними. Такую дериватизацию рационально применять в случае исследования плохоионизируемых и низкомолекулярных соединений. Мы изучили возможность использования трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона **32** для дериватизации соединений с первичной амино-группой с последующей регистрацией масс-спектров MALDI (LDI) продуктов их химических превращений.



В модельных условиях, в присутствии избытка амина, превращение катиона **32** в катион  $Q^+$  можно контролировать визуально по изменению цвета реакционной смеси от фиолетового к красному. Для определения оптимальных условий функционализации аминов нами была изучена реакция между катионом **32** и *n*-бутиламином. В избытке амина уже при комнатной температуре в течение 10 мин в ацетонитриле завершается полная конверсия исходного субстрата **32** в единственный продукт **33**. Полнота превращения легко контролируется обычной ОФ-ВЭЖХ, поскольку соединение **33** поглощает свет в УФ-диапазоне (рис. 15). Реакция не требует каких-либо специальных условий.



**Рис. 15.** Профиль ОФ-ВЭЖХ исходного соединения **32** (левый) и реакционной смеси **32** с *n*-бутиламином (правый). На врезке – спектр поглощения вещества **33**

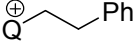
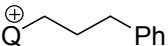
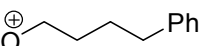
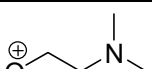
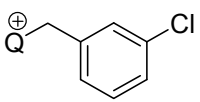
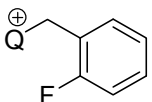
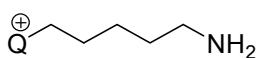

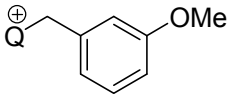
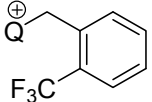
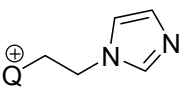
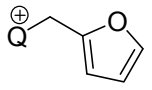
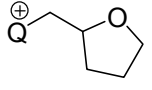
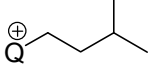
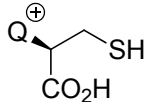
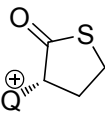
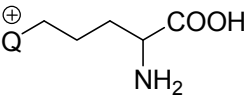

Структура аддукта **33** была подтверждена с помощью 1D и 2D ЯМР-спектроскопии с полным отнесением сигналов в спектрах ЯМР  $^1H$  и  $^{13}C$ . Конъюгат **33** легко детектируется как методом MALDI-МС, так и LDI-МС. Предел обнаружения вещества **33** на мишени масс-спектрометра составляет 25 фмоль.

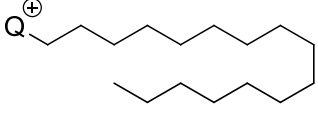
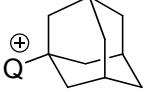
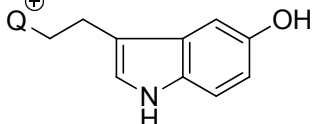
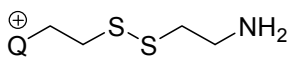
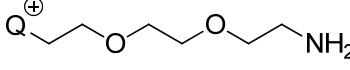
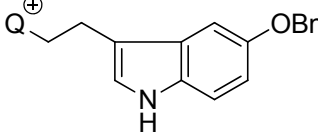
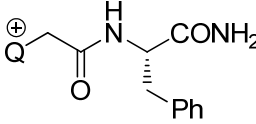
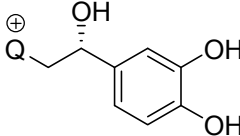
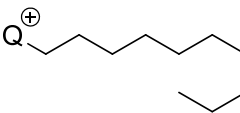
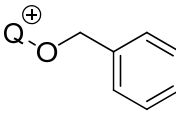
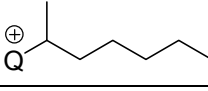
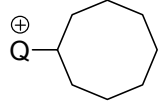
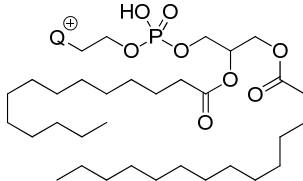
Для установления границ применимости данного метода были проведены эксперименты с различными первичными аминами (табл. 2): гидрофильными и гидрофобными, содержащими гетероциклический фрагмент, стерически затрудненными, ароматическими и биологически активными.

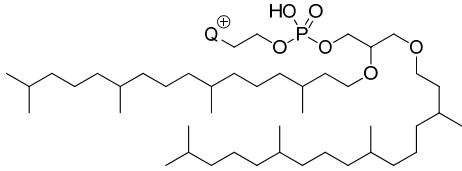
**Таблица 2.** Изученные аналиты и продукты их дериватизации, массовые числа (Да) и относительные интенсивности пиков, соответствующих продуктам дериватизации

№ Образовавшегося катиона	Амин	Продукт дериватизации, $Q^+-R$	$m/z$ (RA, %)
33	<i>n</i> -бутиламин		432 (100)
34	<i>n</i> -пропиламин		418 (100)



35	2-фенилэтиламин		480 (100)
36	3-фенилпропиламин		494 (100)
37	4-фенилбутиламин		508 (100)
38	2-диметиламиноэтиламин		447 (100)
39	3-хлорбензиламин		500 (100)
40	2-фторбензиламин		484 (100)
41	1,5-пентандиамин*		461 (100)
42	анилин		452 (100)
43	3-метоксибензиламин		496 (100)
44	2-(трифторметил)бензиламин		534 (100)
45	1-(2-аминоэтил)-имидазол		470 (100)
46	фурфуриламин		456 (100)
47	тетрагидрофурфуриламин		460 (100)
48	изоамиламин		446 (100)
49	метиловый эфир цистеина		508 (68)
50	гомоцистеинтиолактон		476 (29)
51	лизин		491 (21)
52	трет-бутиламин		432 (18)

53	<i>n</i> -гексадециламин		600 (100)
54	1-адамантиламин		510 (100)
55	серотонин		535 (100)
56	цистамин*		511 (100)
57	1,8-диамино-3,6-диоксаоктан*		507 (100)
58	<i>O</i> -бензилсеротонин		625 (100)
59	амид глицилфениланина		580 (100)
60	норадреналин		528 (100)
61	дециламин		516 (100)
62	<i>O</i> -бензилгидроксиламин		482 (59)
63	2-аминогептан		474 (100)
64	циклооктиламин		486 (100)
65	димиристоилфосфатидил-этанолламин (ДМФЭ)		994 (100)

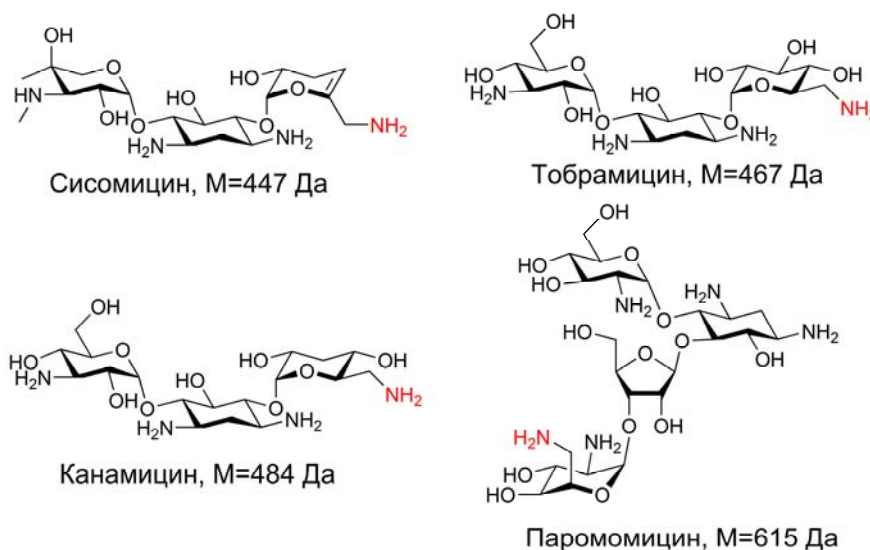
66	дифетанилфосфатидил-этаноламин (ДФФЭ)		1162 (88)
----	---------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-----------

\* Реакция проводилась в избытке амина; в масс-спектрах присутствовали пики ионов только продукта дериватизации по одной аминогруппе

Во всех случаях масс-спектры (МА)LDI продуктов дериватизации содержали интенсивные пики соответствующих катионов  $Q^+R$ . В случае стерически затрудненных и низконуклефильных аминов реакция за 30 мин полностью не проходит, а наблюдаемые интенсивности пиков продуктов дериватизации заметно ниже. Так, при взаимодействии катиона **32** с избытком 1-адамантиламина образуется аддукт **54**, однако интенсивность соответствующего пика иона существенно меньше, чем для исходного катиона **32**, что свидетельствует о неполной конверсии дериватирующего агента **32**.

Также необходимо отметить, что масс-спектры продуктов дериватизации бис-аминов **41**, **56**, **57** и лизина **51** содержали пики ионов, соответствующих продуктам реакции только по одной функциональной амино-группе, независимо от того, проводилась ли реакция с избытком амина или катиона **32**.

Еще одним объектом наших исследований стали аминогликозидные антибиотики, содержащие, как правило, несколько аминогрупп (рис. 16). Помимо аминогрупп, непосредственно связанных с гетероциклом или алициклом, молекулы содержат аминогруппы, связанные с первичным атомом углерода (выделены красным цветом).



**Рис. 16.** Примеры структур аминогликозидных антибиотиков.

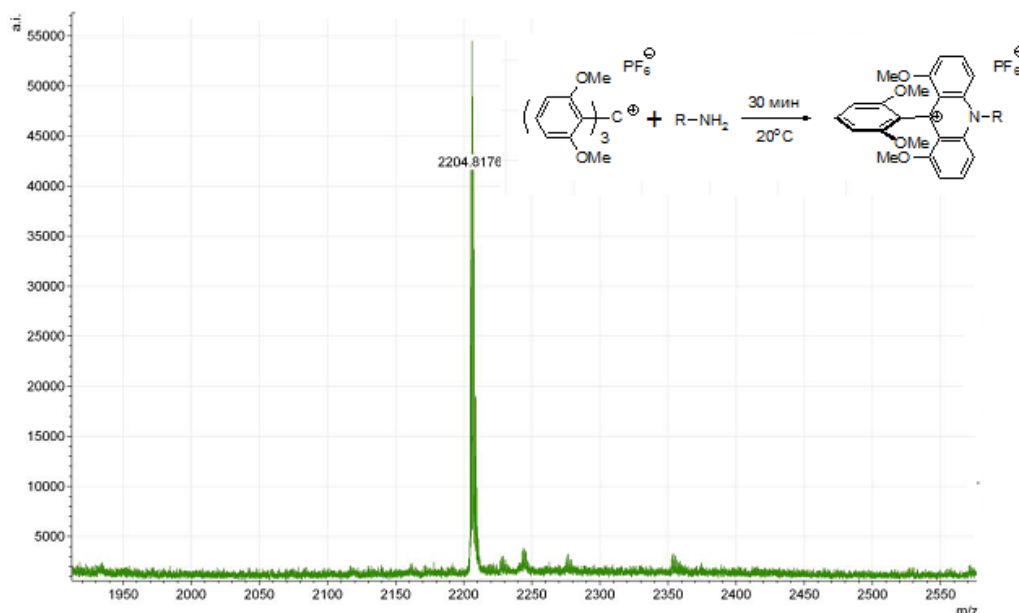
Как показали наши эксперименты, реакция протекает гладко и дает один основной продукт дериватизации по аминогруппе первичного атома углерода. Для всех исследуемых соединений были получены спектры MALDI-МС с четким сигналом монодериватизированных соединений.

Продукт дериватизации аминокликозидов легко детектируется масс-спектрометрически: при нанесении в ячейку мишени масс-спектрометра  $2 \times 10^{-12}$  моль конъюгата в спектре MALDI-МС наблюдается соответствующий сигналу соединения отчетливый пик с высоким соотношением сигнал/шум. Стоит отметить, что увеличение массы исследуемого вещества на 359 Да позволяет сместить сигнал в спектре в сторону больших значений, что исключает перекрывание с сигналами матрицы.

Также был проведен эксперимент с одновременной детекцией всех четырех антибиотиков в смеси: на смесь четырех антибиотиков действовали избытком соли **32** и регистрировали MALDI-масс-спектр образующихся аддуктов. В полученном масс-спектре видны сигналы аддуктов канамицин- $Q^+$ , сисомин- $Q^+$ , тобрамицин- $Q^+$  и паромомицин- $Q^+$ .

## 2.2 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для исследования антибиотического комплекса ИНА-5812

Выделенные с помощью ВЭЖХ фракции антибиотический комплекс из культуры *Streptomyces roseoflavus* ИНА-Ас-5812 были изучены методами масс-спектрометрии и был сделан вывод, что одна из фракций содержит, вероятно, один компонент (масса 1845 Да). Аминокислотный анализ этого компонента показал наличие орнитина в структуре исследуемого вещества<sup>1</sup>. Исследуемая фракция была подвергнута дериватизации избытком трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона в среде вода – ацетонитрил. Такой метод позволяет детектировать в первую очередь амины, содержащие аминогруппу при первичном атоме углерода. Реакция дала один основной продукт, который может быть выделен с помощью ВЭЖХ.



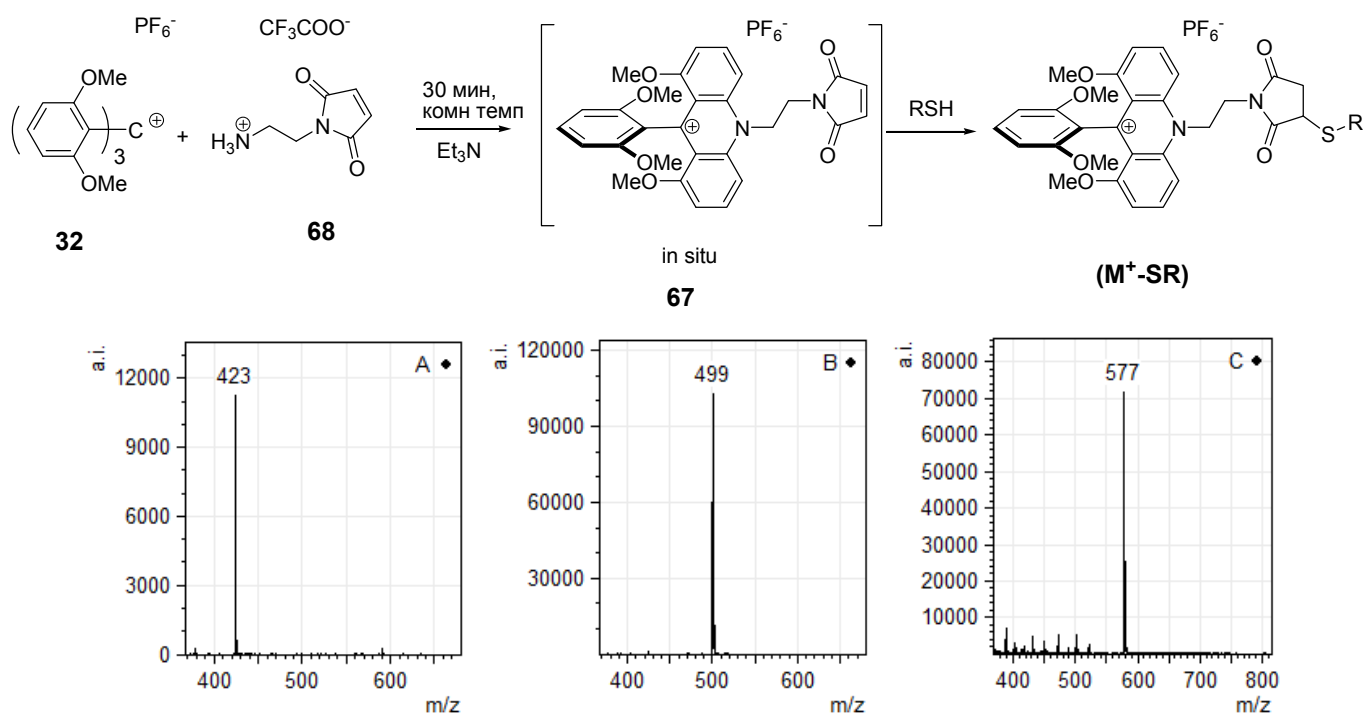
**Рис. 17.** MALDI масс-спектр аддукта ИНА-5812-2 с трис(2,4,6-триметоксифенил)метильным катионом.

<sup>1</sup> Эта часть исследования была проведена коллективом лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе.

Масса полученного производного составила 2204.8 Да (рис. 17), т.е., прибавка массы составила, как и ожидалось, 359 Да. Предположительно, дериватизация происходит по боковой аминогруппе орнитина – наименее затрудненной аминогруппе у первичного атома углерода.

### 2.3 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона и *N*-(2-аминоэтил)-малеимида для дериватизации тиолсодержащих соединений.

Дериватирующий реагент **67** для модификации тиолов был приготовлен *in situ* путем смешивания эквимольных количествах трис(2,6-диметоксифенил)карбений гексафторфосфата **32** и *N*-(2-аминоэтил)малеимида **68** в ацетонитриле в присутствии избытка триэтиламина (рис. 18). Процесс конверсии происходит количественно, и катион **32** не детектируется в реакционной смеси (рис. 18). Соединение **67** содержит постоянный положительный заряд в тритил/акридиниевом фрагменте и малеимидную функциональную группу, которая мягко реагирует с тиолами с образованием аддуктов  $M^+-SR$  (рис. 18)



**Рис. 18** Общая схема дериватизации тиолов. MALDI масс-спектр соединения **32** (A), **67** (B), и **70** (C, R =  $-CH_2CH_2OH$ ) (матрица – синапиновая кислота).

Отметим, что в условиях MALDI-МС тиолы могут быть детектированы в различных матрицах, однако наилучшие результаты достигаются при использовании синапиновой кислоты, НАВА и IAA в качестве матриц. Более того, предлагаемый метод подходит не только для различных видов лазерной десорбции/ионизации (MALDI, LDI и NALDI), а также успешно применен и в случае ионизации электрораспылением.

Для конъюгата **69** нижний предел детекции тиолов методом MALDI-МС составил  $5 \times 10^{-12}$  моль в ячейке масс-спектрометра. Затем мы исследовали дериватизацию различных тиолов (табл. 3) для установления границ применимости нашего метода.

**Таблица 3** Тиолы и их конъюгаты, использованные для MALDI-МС анализа (матрица – синапиновая кислота).

#	Тиол	Продукт дериватизации ( $M^+-SR$ ) <sup>a</sup>	$m/z$ (I, %) <sup>б</sup>
69	этантиол		561 (100)
70	2-меркаптоэтанол		577 (100)
71	тиогликолиевая кислота		591 (100)
72	6-меркаптогексанол		633 (100)
73	6-меркаптогексановая кислота		647 (100)
74	тиофенол		609 (100)
75	2-нафталинтиол		659 (100)
76	2-пиридинтиол		610 (100)
77	трифенилметантиол		775 (29)
78	аллилтиол		573 (100)
79	бензилтиол		623 (100)
80	4-тиометилфенилуксусная кислота		681 (100)
81	<i>трет</i> -бутилтиол		589 (100)
82	эсандитиол-1,2		593 (100)
83	унитиол		687 (16)
84	каптоприл		716 (100)
85	<i>N</i> -ацетилцистеин		662 (100)

<sup>a</sup> Структуру  $M^+$  см. рис. 18.

<sup>б</sup> Значения масс пиков (Да) и относительная интенсивность пиков соответствующих ионов.

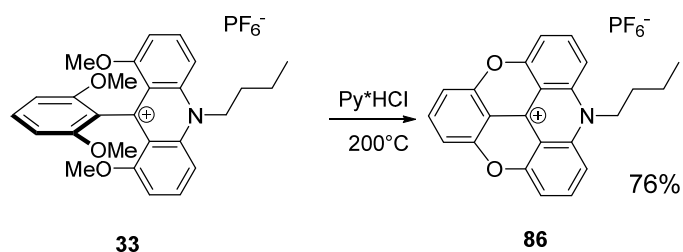
Во всех случаях MALDI масс-спектры содержали интенсивный пик соответствующих катионов  $M^+$ -SR. Примечательно, даже для стерически затрудненных *трет*-бутилтиола и низконуклеофильных тиолов (тиофенол, 2-нафталинфенол, 2-пиридинтиол) наблюдаются интенсивные пики продуктов их дериватизации **81**, **74**, **75**, **76**. Стоит отметить, что масс-спектр MALDI продукта дериватизации бис-тиола (этандитиол-1,2) **82** содержит пик, соответствующий функционализации только по одной SH-группе. Также мы показали возможность дериватизации и определения лекарственных препаратов *N*-ацетилцистеина, каптоприла и унитиола.

Помимо исследования модификации индивидуальных тиолов, мы дериватизировали их смеси. Смесь тиофенола, меркаптогексанола и меркаптогексановой кислоты была обработана избытком реагента **32**. В масс-спектре такой реакционной смеси присутствуют сигналы каждого продукта дериватизации и избытка реагента **67**. Также мы предложили последовательную *one pot* процедуру восстановления дисульфидов с помощью  $Vu_3P$  с последующей дериватизацией масс-спектрометрической меткой **67** и показали её применение на примере модификации дитиогликолиевой кислоты.

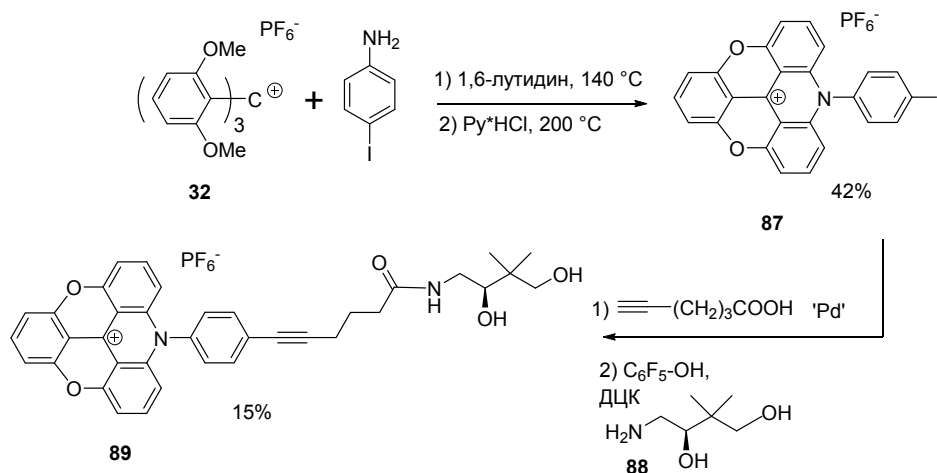
## 2.4 Синтез и масс-спектрометрические свойства производных триангуленового катиона

При продолжительном нагревании акридиниевый катион последовательно циклизуется в триангуленовый. Это свойство мы решили использовать для синтеза триангуленовой масс-спектрометрической неотщепляемой метки. На модельном субстрате мы отработали условия реакции и выделения продукта циклизации.

Продукт **86** был выделен, очищен колоночной хроматографией, а его структура доказана двумерной ЯМР спектроскопией. В спектре MALDI-МС соединения **86** виден четкий сигнал, соответствующий триангуленовому катиону.



Для введения функциональной группы в триангуленовый катион мы предложили следующий подход:



На первой стадии трис(2,6-диметоксифенил)метильный катион **32** реагирует с 4-иоданилином. В отличие от алифатических субстратов, менее нуклеофильный 4-иоданилин вступает в реакцию только при 140°C, а затем промежуточное акридиниевое производное циклизуется в иодсодержащий триангуленовый субстрат **87**. Наличие в структуре **87** атома иода в ароматическом кольце открывает возможности проведения реакций кросс-сочетания. Мы продемонстрировали возможность проведения палладий-катализируемой реакции Соногаширы с участием субстрата **87**, с последующим превращением в амид **89**. Соединение **89** было выделено и охарактеризовано, его структура доказана с помощью двумерной ЯМР спектроскопии. (3*R*)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диол **88** выбран не случайно – он служит удобной моделью дезоксирибозы, и его производные могут быть использованы в синтезе олигонуклеотидов, содержащих одновременно УФ- и масс-спектрометрическую метку.

———— \* \* \* ————

## ВЫВОДЫ

1. На основе *S*-связанных тритильных соединений синтезированы новые метки с регулируемой массой, отщепляемые и детектируемые в масс-спектрометре в виде стабилизированного карбокатиона (методом лазерной десорбции/ионизации). На примере мечения полимерной поверхности и дендримера показана возможность их использования для двоичного кодирования информации.
2. Изучены реакции триарициклопропенилиевых катионов с нуклеофилами. Обнаружена неизвестная ранее перегруппировка трифенилциклопропенилиевого катиона под действием первичных аминов. Показана применимость *S*-связанных триарициклопропенилиевых аддуктов в качестве отщепляемых масс-спектрометрических меток. На примере *N*-оксисукцинимидного эфира 6-(трифенилциклопропенилтио)-гексановой кислоты продемонстрировано успешное использование этого класса соединений для высокочувствительной детекции (предел обнаружения 30 амоль) низкомолекулярных аминов методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с промежуточной дериватизацией.
3. Трис-(2,6-диметоксифенил)метиловый катион предложен в качестве реагента для перманентной дериватизации и масс-спектрометрической детекции методом лазерной десорбции/ионизации различных классов биомолекул, содержащих аминокгруппу – низкомолекулярных органических аминов, аминокислот, пептидов, фосфолипидов, пептидных и аминокглизидных антибиотиков, как в индивидуальном виде, так и в смеси. Дериватизация позволяет повысить чувствительность метода на 2–3 порядка.



4. Показано успешное использование генерируемого *in situ* конъюгата трис-(2,6-диметоксифенил)метилиевого катиона и *N*-(2-аминоэтил)малеимида для детекции тиол-содержащих органических соединений, лекарственных препаратов и их смесей, а также дисульфидов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи и патенты

1. **Топольян А.П.**, Стрижевская Д.А., Слюндина М.С., Беляева М.А., Иванова О.М., Коршун В.А., Устинов А.В., Михура И.В., Формановский А.А., Борисов Р.С. Дериватизация первичных аминов катионом трис(2,6-диметоксифенил)метилия для анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ. *Масс-спектрометрия*, **12** (4), 253–258 (2015).  
Engl. transl.: **Topolyan A.P.**, Strizhevskaya D.A., Slyundina M.S., Belyaeva M.A., Ivanova O.M., Korshun V.A., Ustinov A.V., Mikhura I.V., Formanovsky A.A., Borisov R.S. Tris(2,6-dimethoxyphenyl)methyl carbenium ion as a charge derivatization agent for the analysis of primary amines by MALDI mass spectrometry. *J. Anal. Chem.*, **71** (14), 1326–1331 (2016).
2. **Topolyan A.P.**, Strizhevskaya D.A., Belyaeva M.A., Brylev V.A., Ustinov A.V., Formanovsky A.A., Korshun V.A. A triphenylcyclopropenylum mass tag: synthesis and application to ultrasensitive LC/MS analysis of amines. *Analyst*, **141** (11), 3289–3295 (2016).
3. **Топольян А.П.**, Беляева М.А., Быков Е.Е., Кудан П.В., Рогожин Е.А., Стрижевская Д.А., Иванова О.М., Устинов А.В., Михура И.В., Прохоренко И.А., Коршун В.А., Формановский А.А. Дериватизация аминогликозидных антибиотиков трис(2,6-диметоксифенил)метилям. *Acta Naturae*, **8** (3), 139–146 (2016).  
Engl. transl.: **Topolyan A.P.**, Belyaeva M.A., Bykov E.E., Coodan P.V., Rogozhin E.A., Strizhevskaya D.A., Ivanova O.M., Ustinov A.V., Mikhura I.V., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Formanovsky A.A. Derivatization of aminoglycoside antibiotics with tris(2,6-dimethoxyphenyl)carbenium ion. *Acta Naturae*, **8** (3), 128–135 (2016).
4. Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Гладких Е.Г., Куляева В.В., Кудан П.В., **Топольян А.П.**, Алфёрова В.А., Погожева В.В., Суконников М.А., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Брылёв В.А., Королёв А.М., Слюндина М.С., Борисов Р.С., Серебрякова М.В., Шувалов М.В., Ксенофонов А.Л., Стоянова Л.Г., Остерман И.А., Формановский А.А., Ташлицкий В.Н., Баратова Л.А., Тимофеева А.В., Тюрин А.П. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812. *Биоорганическая химия*, **42** (6), 732–740 (2016).  
Engl. transl.: Lapchinskaya O.A., Katrukha G.S., Gladkikh E.G., Kulyaeva V.V., Coodan P.V., **Topolyan A.P.**, Alferova V.A., Pogozheva V.V., Sukonnikov M.A., Rogozhin E.A., Prokhorenko I.A., Brylev V.A., Korolev A.M., Slyundina M.S., Borisov R.S., Serebryakova M.V., Shuvalov M.V., Ksenofontov A.L., Stoyanova L.G., Osterman I.A., Formanovsky A.A., Tashlitsky V.N., Baratova L.A., Timofeeva A.V., Tyurin A.P. Investigation of the complex antibiotic INA-5812. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **42** (6), 664–671 (2016).
5. **Топольян А.П.**, Устинов А.В., Брылёв В.А., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Стрижевская Д.А., Коршун В.А., Формановский А.А., Беляева М.А. Способ детекции аминов. *Патент РФ* **2580653** (2016).

### Материалы конференций и симпозиумов

6. **Топольян А.П.**, Прохоренко И.А., Коршун В.А., Устинов А.В. Масс-спектрометрические метки для детекции ДНК-фрагментов. XXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 7–9 февраля 2012 г. Тезисы докладов и стендовых сообщений, 98.
7. **Топольян А.П.**, Брылёв В.А., Устинов А.В., Формановский А.А. Использование масс-спектрометрических меток на основе тритильного карбокатиона для мечения полимерных поверхностей. «Менделеев-2014» VIII Всероссийская конференция с международным участием

молодых учёных по химии, Санкт-Петербург, Россия, 1–4 апреля 2014 г. Тезисы докладов (Секция 1. Химическое материаловедение. Секция 3. Новые аналитические методы в химии), 337–338.

8. **Topolyan A.P.**, Ustinov A.V., Brylev V.A., Strizhevskaya D.A., Rogozhin E.A., Prokhorenko I.A., Nozhevnikova E.V., Korshun V.A., Formanovsky A.A. Trityl/acridine mass tag derivatization of primary amines: application for detection of aminoglycoside antibiotics. V International Conference «Chemistry, Structure and Function of Biomolecules». Minsk, 4–6 June, 2014, Book of abstracts, 18–19.
9. **Topolyan A.P.**, Brylev V.A., Ustinov A.V., Formanovsky A.A., Korshun V.A. Carbocationic mass tags for information encoding and multiplex bioanalytical applications. 62<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. Baltimore, Maryland, USA, 15–19 June, 2014, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **25** (1 Suppl.), 123 (2014).
10. Коршун В.А., **Топольян А.П.**, Стрижевская Д.А., Беляева М.А., Брылёв В.А., Рогожин Е.А., Зенкова В.А., Ефременкова О.В., Слюндина М.С., Королёв А.М., Быков Е.Е., Формановский А.А. Масс-спектрометрическая метка для пептидов. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск, 12–17 июля 2015 г., Материалы симпозиума, 260.
11. Алфёрова В.А., **Топольян А.П.**, Куляева В.В., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Брылёв В.А., Шенкарёв З.О., Кудан П.В., Шувалов М.В., Слюндина М.С., Королёв А.М., Катруха Г.С., Гладких Е.Г., Лапчинская О.А., Тюрин А.П. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812. Международная конференция «Химическая биология» посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 24–28 июля 2016 г., Материалы конференции, 185.
12. Belyaeva M.A., **Topolyan A.P.**, Slyundina M.S., Korshun V.A., Borisov R.S. Derivatization of primary amines with tris-(2,6-dimethoxyphenyl)-methyl cation for the analysis by MALDI mass spectrometry. 2<sup>nd</sup> International Conference “Innovations in Mass Spectrometry: Instrumentation and Methods”. Moscow, Russia, November 7–11, 2016, Conference materials, 51.
13. **Topolyan A.P.**, Belyaeva M.A., Brylev V.A., Ustinov A.V., Korshun V.A., Formanovsky A.A. Ultrasensitive LC/MS analysis of amines with triphenylcyclopropenium mass tag. 2<sup>nd</sup> International Conference “Innovations in Mass Spectrometry: Instrumentation and Methods”. Moscow, Russia, November 7–11, 2016, Conference materials, 73.

### Список сокращений:

ВЭЖХ – (HPLC) высокоэффективная жидкостная хроматография

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

РАМАМ - полиамидамин (дендример)

NALDI - nanowire-assisted laser desorption/ionization

НАВА - 2-(4-гидроксифенилазо)бензойная кислота

IAA – *транс*-3-индолакриловая кислота