

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель

д.х.н. А.А. Формановский

Москва 2017

## Содержание

Содержание	2
Список сокращений	4
Введение	6
<b>Глава 1. Химия ионогенных масс-спектрометрических меток</b> (Обзор литературы)	9
1.1. Неотщепляемые ионогенные масс-спектрометрические метки	9
1.1.1 Детекция пептидов и белков	10
1.1.1.1 Модификация по аминогруппе	11
1.1.1.1.1 Гуанидильное	12
1.1.1.1.2 Третичные амины и четвертичные аммониевые катионы	13
1.1.1.1.3 Четвертичные фосфониевые катионы	16
1.1.1.1.4 Триарилметильные катионы	17
1.1.1.1.5 Модификация анионами	19
1.1.1.2 Модификация по карбоксильной группе	19
1.1.1.3 Модификация по тиольной группе	22
1.1.1.4 Другие подходы (модификация ПАУ)	27
1.1.2 Детекция углеводов	28
1.1.2.1 Модификация по аминогруппе	28
1.1.2.2 Модификация по карбонильной группе	31
1.1.2.3 Модификация по гидроксильным группам	34
1.1.2.4 Модификация по карбоксильной группе	34
1.1.3 Детекция жирных кислот и липидов	35
1.1.4 Детекция низкомолекулярных органических соединений	37
1.2. Отщепляемые ионогенные масс-спектрометрические метки	41
1.2.1 Общие представления о технологии MALDI-МС-визуализации	42
1.2.1.1 Ионизация в методе MALDI-МС-визуализации	43
1.2.1.2 Техника получения изображения: режимы микрозонда и микроскопа	45
1.2.1.3 Разрешение	46
1.2.1.4 Подготовка образцов для MALDI-МС-визуализации	47
1.2.1.5 Обработка и визуализация данных	49

1.2.1.6 Применение MALDI-МС-визуализации	49
1.2.2 Отщепляемые масс-спектрометрические метки	51
<b>Глава 2. Масс-спектрометрические метки на основе стабильных карбокатионов</b>	
(Результаты и обсуждение)	63
2.1 Отщепляемые масс-спектрометрические метки	63
2.1.1 Отщепляемые масс-спектрометрические метки на основе тритильного катиона	63
2.1.2 Отщепляемые масс-спектрометрические метки на основе трифенилциклопропенилиевого катиона	73
2.2 Неотщепляемые масс-спектрометрические метки	87
2.2.1 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для дериватизации первичной аминогруппы низкомолекулярных биорегуляторов	88
2.2.2 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для дериватизации аминоксодержащих фосфолипидов	99
2.2.3 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для дериватизации аминогликозидных антибиотиков	100
2.2.4 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для исследования антибиотического комплекса ИНА-5812	107
2.2.5 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона и N-(2-аминоэтил)малеимида для дериватизации тиолсодержащих соединений	108
2.2.6 Синтез и масс-спектрометрические свойства производных триангуленового катиона	115
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	120
Выводы	170
Благодарности	171
Литература	172
Приложения	202

## Список сокращений

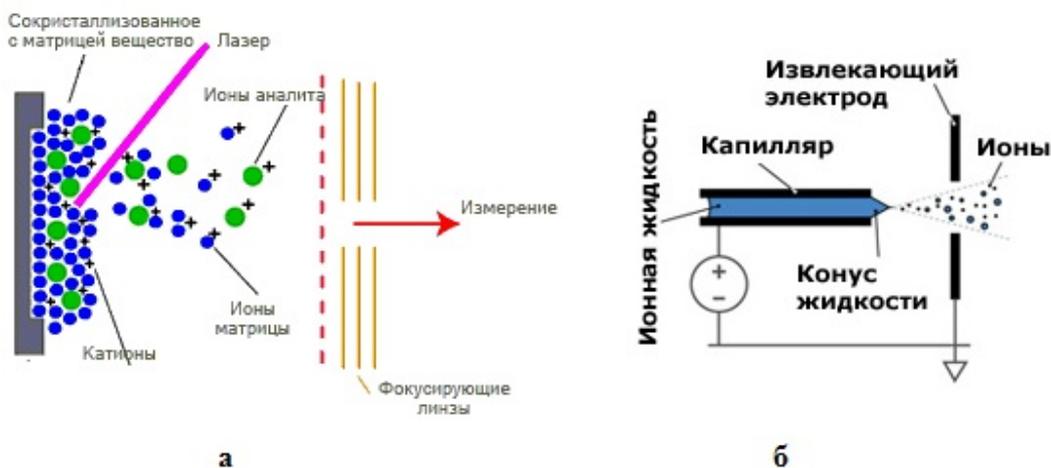
- ABCO – 1-азабицикло[2.2.2]октан  
 ADIBO – азадибензоциклооктан  
 AT – 1,8,9-anthracentriol  
 CHCA –  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid  
 DABCO – 1,4-диазабцикло[2.2.2]октан  
 DBU – 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene  
 DHB – 2,5-дигидроксibenзойная кислота (2,5-dihydroxybenzoic acid)  
 DMAP – 4-диметиламинопиридин  
 DMT-ММ – 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride  
 (конденсирующий реагент)  
 DTT – дитиотреит  
 EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (конденсирующий реагент)  
 ESI – ионизация электрораспылением (electrospray ionization)  
 Glc – глюкоза  
 НАВА – 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid  
 НОВt – 1-гидроксibenзотриазол  
 IAA – *trans*-3-indoleacetic acid  
 ICAT – изотопно кодируемая аффинная метка (isotope-coded affinity tag)  
 LC – жидкостная хроматография  
 LOD – нижний предел детекции  
 MALDI – матрично-активированная (промотируемая матрицей) лазерная десорбция/ионизация (matrix assisted laser desorption/ionization)  
 MRM – множественный мониторинг реакций (multiple reaction monitoring)  
 MS-MS – тандемная масс-спектрометрия  
 NALDI – nanowire-assisted laser desorption/ionization  
 ПАМАМ – полиамидамин (дендример)  
 Рх – пиксил (9-phenylxanthyl, pixyl)  
 PyAOP – (7-azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate  
 SIM – режим выбора иона (selected ion mode)  
 ТВТА – трис[(1-бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин  
 ТСЕР – трис(2-карбоксиэтил)фосфин  
 ТНАР – 2',4',6'-тригидроксиацетофенон моногидрат (2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate)  
 ТМЕДА – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин  
 ТМРР – трис(2,4,6-триметилфенил)фосфоний)
- АПФ – ангиотензинпревращающий фермент  
 БСА – бычий сывороточный альбумин  
 ВЭЖХ – (HPLC) высокоэффективная жидкостная хроматография  
 ДАС – (CID) диссоциация, активируемая соударением (collision-induced dissociation)  
 ДМСО – диметилсульфоксид  
 ДМФА – диметилформамид  
 ДМФЭ – димиристоилфосфатидил-этаноламин

ДНФГ	– 2,4-динитрофенилгидразин
ДОО	– диссоциация при отрыве электрона
ДФФЭ	– дифетанилфосфатидил-этаноламин
ДХМ	– дихлорметан
ДЦК	– N,N'-дициклогексилкарбодиимид
ДЭЗ	– диссоциация при электронном захвате
ИКМФД	– инфракрасная мультифотонная диссоциация
МС	– масс-спектрометрия
ПАУ	– полициклические ароматические углеводороды
ПММА	– полиметилметакрилат
ТГФ	– тетрагидрофуран
ТСХ	– тонкослойная хроматография
УФ	– ультрафиолетовый
УЭЖХ	– (UPLC) ультраэффективная жидкостная хроматография
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс

## Введение

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 и появляются всё новые области применения МС. Выпускается несколько специализированных научных журналов, посвященных различным аспектам МС [1]. Появляются всё новые монографии и учебники, в которых обобщаются достижения в данной области [2–76]. Существуют многочисленные учебные и справочные онлайн-ресурсы по МС [77].

В МС исследуют ионы (заряженные атомы, молекулы, кластеры и т.д., вплоть до отдельных вирусных частиц), движущиеся в магнитном поле. С помощью масс-спектрометров определяют отношение массы исследуемой частицы к ее заряду. Поэтому ионизация (придание молекуле заряда) – это фундаментальная проблема в МС. Способ ионизации служит основной отличительной чертой в классификации методов МС. В настоящее время наибольшее распространение получили методы матрично-активированной (промотируемой матрицей) лазерной десорбции/ионизации (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) [78–85] и ионизации электрораспылением (ESI, electrospray ionization) [86–90]. В методе MALDI анализируемое вещество добавляется к хорошо кристаллизующемуся низкомолекулярному полярному ароматическому веществу, так называемой матрице; при испарении под действием мощного лазера кристаллов матрицы в вакууме происходит десорбция с подложки анализируемых молекул с их одновременной ионизацией (рис. 1.1а). В методе электрораспыления мельчайшие капли раствора анализируемого вещества разбрызгиваются в электрическом поле, при этом происходит испарение растворителя и ионизация анализируемого вещества (рис. 1.1б).

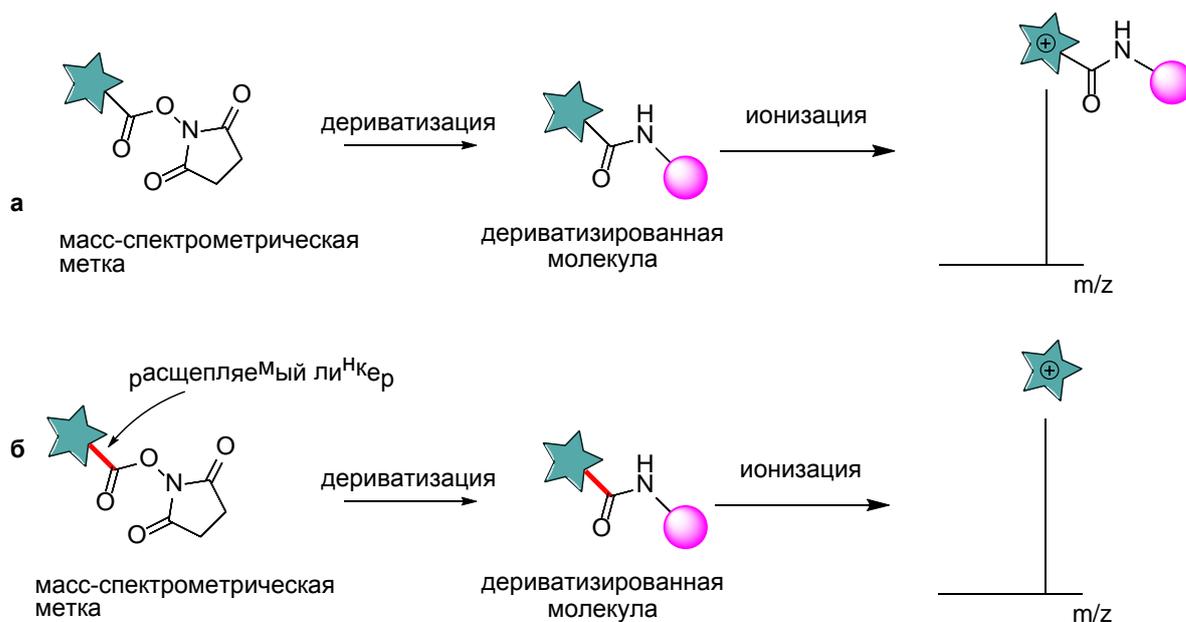


**Рис. 1.1** а) принцип метода масс-спектрометрии MALDI, б) принцип метода ионизации электрораспылением (ESI).

Склонность анализируемых веществ к ионизации может быть различна. Для *индивидуального* молекулярного вещества всегда можно подобрать подходящие условия ионизации и МС-анализа. Однако, детекция присутствия вещества *в смеси* представляет большой практический интерес (анализ многокомпонентной смеси оказывается гораздо более сложной проблемой). Если молекулы целевых веществ ионизируются плохо, то часто спектр формируют сигналы лучше ионизирующихся веществ, а пики целевых веществ могут затеряться на уровне фона. Диапазон способности биомолекул к ионизации весьма велик: например, короткие аргининсодержащие пептиды детектируются в МС весьма эффективно, а полярные олигосахариды – с большим трудом.

Таким образом, для достоверного определения соединений с помощью МС необходимо повысить их способность к ионизации. Способность к ионизации эффективнее всего можно повысить с помощью химической модификации (дериватизации) анализируемых соединений. Дериватизация широко применяется в МС [91–117]. Даже простое блокирование (ацилирование, силилирование и т.д.) полярных гидроксильных групп вещества приводит к увеличению его «летучести» в масс-спектрометрах и, соответственно, к снижению предела детекции с помощью МС. Для улучшения ионизируемости молекул можно также вводить в них полярные группы – *способные к легкой ионизации или уже заряженные*; именно такие модификации рассматриваются в обзоре литературы (Глава 1). Помимо повышения чувствительности дериватизация также решает задачи по изменению физико-химических характеристик вещества (увеличение летучести, повышение термостабильности), выявлению структурных особенностей (локализация заряда, детерминация и локализация функциональных групп), при этом масса анализируемого вещества или его фрагмента увеличивается на некоторую величину (инкремент), характерную для данной метки [118].

Кроме перманентных масс-спектрометрических меток, ковалентно присоединяемых к молекуле и анализируемых в спектрометре в виде конъюгата (рис. 1.2а), существует и другой принцип мечения (био)молекул. В этом случае конъюгат (био)молекула–метка участвует в каких-либо биохимических/физико-химических процедурах, включающих разделение компонентов, а затем метка отщепляется в виде иона и детектируется в МС (рис. 1.2б). Если для нескольких видов молекул использовать метки похожей природы, но различной массы, то по масс-спектру можно легко определить как присутствие, так и относительное содержание анализируемых веществ. Метод, в силу очевидных соображений, может иметь высокие показатели мультиплексности (большое число одновременно определяемых веществ). Ионогенные отщепляемые метки рассматриваются во второй части Главы 1.



**Рис. 1.2** Принципиальная схема дериватизации и последующей детекции биомолекул с помощью неотщепляемых (перманентных) (а) и отщепляемых (б) масс-спектрометрических меток.

Масс-спектрометрические метки (mass tags), как перманентные, так и отщепляемые, предназначены для решения широкого круга аналитических задач в области биоорганической химии, экологии, молекулярной биологии, иммунологии, генетического анализа и т.д. Их разработка является актуальной задачей. В рамках данной диссертационной работы делается попытка развития некоторых подходов в области масс-спектрометрических меток, как *отщепляемых*, так и *неотщепляемых*. В качестве *ионогенных групп* изучены производные стабилизированных карбокатионов – трифенилметильного и трифенилциклопропенилиевого. В работе предложены новые реагенты и новые методы анализа аминов – как легких летучих аминов, так и различных физиологически активных аминов, в частности, аминогликозидных антибиотиков. Одна из меток применена для исследования нового аминогликозидного антибиотика.

Работа выполнена в Лаборатории органического синтеза Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) при взаимодействии с коллегами из Группы биоконъюгации и Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН, Лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАН и Лаборатории спектральных исследований Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН.

## Глава 1. Химия ионогенных масс-спектрометрических меток (Обзор литературы)

Предметом рассмотрения данного обзора будет служить ковалентная модификация молекул масс-спектрометрическими метками, содержащими электрический заряд, или способными к ионизации тем или иным способом с последующей детекцией в МС конъюгата молекула–метка или отщепившейся от конъюгата индивидуальной метки. Как уже было сказано, ионогенные масс-спектрометрические метки можно подразделить на 1) неотщепляемые и 2) отщепляемые. У каждого из этих классов меток имеется своя область применения, и они рассмотрены в двух разделах обзора литературы.

Разумеется, в литературе неоднократно обсуждались те или иные аспекты применения масс-спектрометрических меток (например, в обзорах по дериватизации в МС, по методам исследования в протеомике или по детекции того или иного класса веществ). Однако нам не удалось найти обзоры, рассматривающие ионогенные масс-спектрометрические метки с химической точки зрения.

Следует отметить, что в масс-спектрометрической детекции биомолекул широкое распространение получили методы, основанные на применении стабильных изотопов. В этом случае образцы из различных источников (тканей, организмов, штаммов и т.п.) модифицируют («метят») реагентами, химически одинаковыми, но немного различающимися по массе в результате замены нескольких атомов стабильными изотопами, в первую очередь  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Эта процедура делает возможным количественное сопоставление содержания определённых молекул в различных образцах. Реагенты, используемые в подобных методах (ICAT [119–122] и др.), не являются предметом рассмотрения данного обзора, за исключением тех случаев, когда модификация содержит *ионогенную* (способную к ионизации или уже ионизированную) группу.

### 1.1 Неотщепляемые ионогенные масс-спектрометрические метки

Для рассмотрения меток, предназначенных для МС-анализа (био)молекул в виде *ковалентных конъюгатов*, необходимо выбрать адекватную классификацию материала. Можно рассматривать литературные данные с точки зрения:

- химической природы ионогенной группы метки;
- химической природы функциональной группы (в анализируемой молекуле), по которой проводится модификация;
- типа детектируемых/модифицируемых молекул.

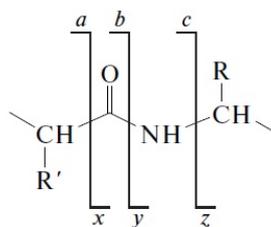
Эти три подхода имеют свои достоинства и недостатки. Поскольку для основной массы исследователей представляет интерес прикладной аспект детекции с помощью МС

преимущественно биологически значимых молекул, мы в настоящем обзоре старались рассмотреть материал в первую очередь с использованием последнего способа классификации (по типу анализируемых веществ), и лишь в пределах каждого типа веществ применить последовательно классификации по модифицируемой функциональной группе и ионогенной группировке. Такой подход наименее оправдан с точки зрения органической химии (описывающей синтез метки и реакции модификации), но наиболее удобен для читателей, специализирующихся в определённых областях биоорганической химии и молекулярной биологии, которым, собственно, и могут потребоваться в исследованиях масс-спектрометрические метки.

### 1.1.1 Детекция пептидов и белков

Из всех типов биологически значимых молекул наиболее массовый характер приобрела масс-спектрометрическая детекция белков и пептидов. Это связано, прежде всего, с исключительной важностью и разнообразием функций белков в живых организмах. От установления структуры и функции отдельных белков наука перешла к их сплошному скринингу. В протеомике были разработаны высокопроизводительные методы анализа, в первую очередь основанные на МС. Зачастую некоторые белки, например, белки-мишени лекарств или биомаркеры, присутствуют в очень низких концентрациях в реальных образцах сложных белковых смесей, что сильно затрудняет их детекцию. Общим методом исследования строения белков является их ферментативное расщепление на пептиды различной длины с последующим анализом полученных фрагментов с помощью МС. При этом решаются проблемы, связанные с различием свойств пептидов в условиях МС. Поэтому были разработаны методы химической модификации пептидов для введения в них ионогенной группы.

Важнейшей задачей протеомики, как сказано выше, служит определение аминокислотной последовательности пептидов и белков. В последние годы разработан ряд масс-спектрометрических методов секвенирования [123–128]. Их преимущество по сравнению с классическими методами биохимии (деградация по Эдману) – более высокая чувствительность (МС-методы позволяют проводить анализ на атто- и зепта-молярных количествах аналита) и возможность изучения посттрансляционных модификаций. Комбинация МС с ВЭЖХ позволяет избежать процедур очистки и пробоподготовки пептидов. Особый практический интерес представляет масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование пептидов. Тандемный масс-спектр MS-MS для этих целей получают фрагментацией протонированных молекул пептида. На рис. 1.3 представлены возможные пути фрагментации полипептидной цепи и серии образующихся ионов.



**Рис. 1.3** Возможные пути фрагментация полипептидной цепи при ионизации в MS-MS.

Для активации разрывов различных связей используют такие методы, как ДАС (диссоциация, активированная соударениями), ДЭЗ (диссоциация при электронном захвате), УФ-фотодиссоциация, ДОЭ (диссоциация при отрыве электрона), ИКМФД (инфракрасная мультифотонная диссоциация).

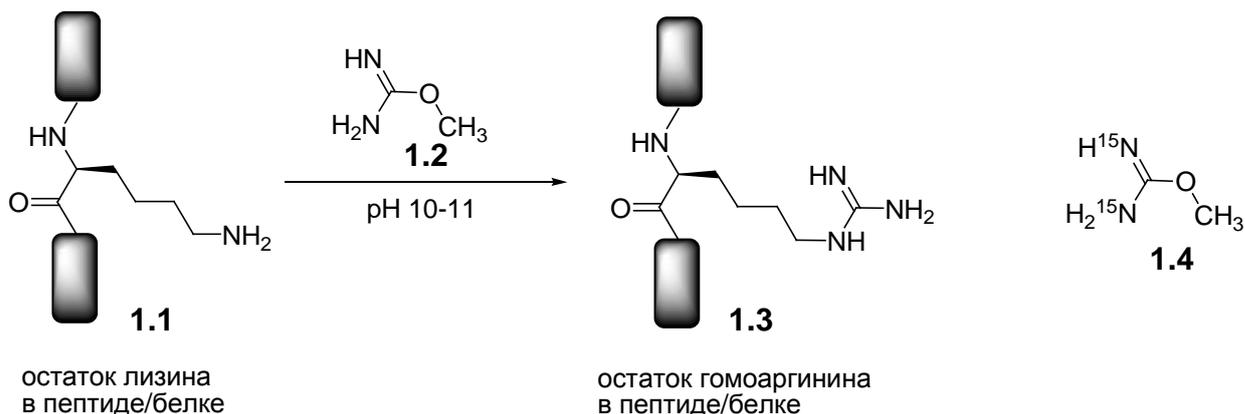
Дериватизация белков и пептидов имеет своей целью не только увеличение ионизационных способностей анализируемых молекул, но и в некоторых случаях усиление специфической фрагментации, что может существенно облегчить трудоёмкую задачу по идентификации исследуемых соединений. Некоторые ранние методы дериватизации пептидов ионогенными метками рассмотрены в отличном обзоре 1998 г. [92], поэтому здесь они будут упомянуты кратко. Также стоит отметить обзор 2014 г. [129] по химической дериватизации пептидов и пептидов с посттрасляционными модификациями.

#### 1.1.1.1 Модификация по аминогруппе

В любом пептиде или белке присутствует, по крайней мере, одна аминогруппа – N-терминальная. Кроме того, в их состав часто входит остаток лизина, содержащий аминогруппу в боковой цепи. Например, при трипсинолизе происходит расщепление белков по остаткам основных аминокислот, аргинина и лизина, в результате в каждом полученном пептиде имеется один остаток аргинина или лизина в качестве C-терминальной аминокислоты. Склонность гуанидиновой группы аргинина к протонированию примерно на два порядка больше, чем у аминогруппы лизина (рКа протонированных форм 12.48 и 10.53, соответственно). Основность N-концевой аминогруппы обычно ещё меньше (рКа около 9.0). В результате, в MS чувствительность детекции (интенсивность пика  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) аргининсодержащих пептидов наибольшая, а пептидов, не содержащих остатков ни аргинина, ни лизина, – наименьшая (для пептидов одинаковой длины и похожего аминокислотного состава). Специальное исследование показало, что замена в пептиде остатка лизина на остаток аргинина приводит, как правило, к возрастанию интенсивности молекулярного пика в MALDI-MS более чем в 4 раза (до 18 раз) [130]. Таким образом, гуанидиновую группировку можно считать ионогенной.

### 1.1.1.1.1 Гуанидирование

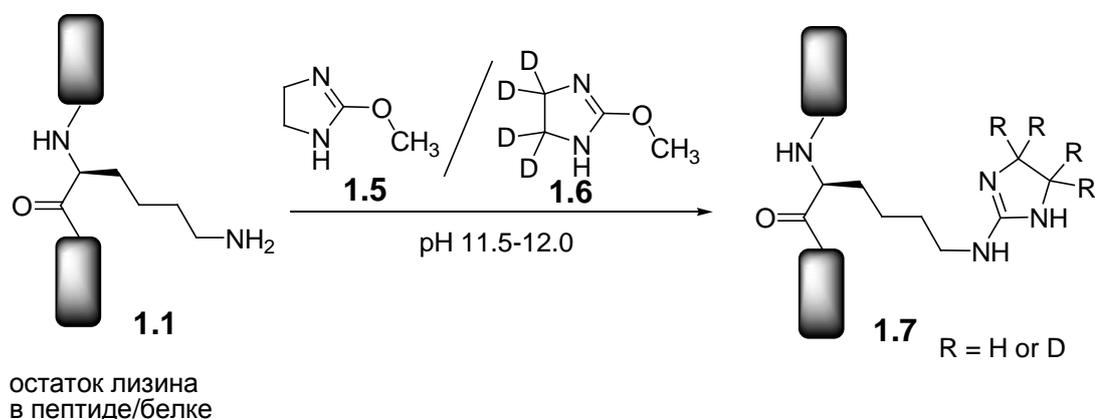
Гуанидирование белков, т.е. замена аминогрупп в боковых цепях лизиновых остатков на гуанидин, известно давно [131 и цитированные там работы]. Остаток лизина **1.1** в белках действием *O*-метилизомочевины **1.2** в щелочной среде гладко превращается в остаток гомоаргинина **1.3**. Эта реакция может быть применена ко всем устойчивым при pH 10–11 белкам, содержащим остаток лизина. По мере развития методов МС она стала широко использоваться для «выравнивания» ионизации триптических пептидов [132–142].



Было показано, что гуанидирование белков усиливает их специфичную фрагментацию при плазменной десорбции с использованием  $^{252}\text{Cf}$  [132]. Гуанидирование белка перед расщеплением карбоксипептидазами позволяет различить Lys и Gln (массы 128.17 и 128.13 Да, соответственно) в полученных пептидах [133]. Были разработаны методы гуанидирования триптических пептидов исключительно по боковой аминогруппе остатка лизина [134–138], причём время реакции гуанидирования было сокращено до 5 мин, а рабочие концентрации белка достигали 50 фмоль [138]. Вещество **1.2** обычно применяют в виде гидросульфата. Недавно было показано, что использование реагента **1.2** в виде свободного основания позволяет избежать процедур обессоливания и приводит к дополнительному увеличению интенсивности пиков пептидов в MALDI-МС. Например, для триптического пептида БСА гуанидирование свободным основанием увеличивает интенсивность пика более чем в 10 раз по сравнению с дериватизацией гидросульфатом **1.2** [142]. Для количественной протеомики предложен изотопно-меченый реагент **1.4**, позволяющий определить соотношение одинаковых пептидов в смеси двух образцов из различных источников, используя разницу в массе в 2 Да [139].

Для модификации боковых аминогрупп остатков лизина использовался также циклический реагент **1.5** в немного более щелочной среде [143–145]. Продуктом модификации в этом случае является циклическое производное гомоаргинина – остаток

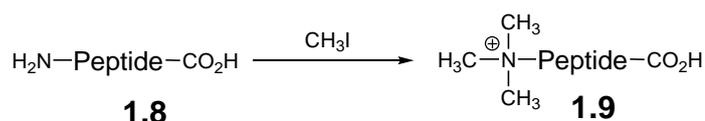
*N*<sup>ε</sup>-(4,5-дигидро-1*H*-имидазол-2-ил)-лизина **1.7**. Изомочевина **1.5** даёт бóльшую прибавку массы при модификации аминов, чем реагент **1.2**. Получен также реагент **1.6**, масса которого увеличена на 4 Да за счёт замещения атомов водорода в цикле на дейтерий [143].



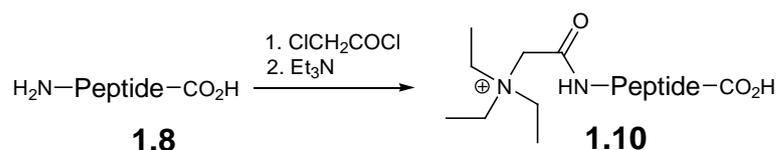
#### 1.1.1.1.2 Третичные амины и четвертичные аммониевые катионы

Триалкиламины обладают высокой основностью и склонностью к протонированию (например, рКа протонированного триэтиламина 10.75), а четвертичные аммониевые катионы несут постоянный положительный заряд. Обе эти группы нашли применение для ионогенной функционализации пептидов. Но дериватизация аминогрупп проводилась только с образованием производных четвертичных аммониевых солей.

Четвертичный аммониевый катион на пептиде может быть получен из терминальной аминогруппы. При прямой кватернизации аминогруппы пептида **1.8** обработкой его метилиодидом выходы катиона **1.9** невелики [146]; метод разрабатывался для масс-спектрометрического секвенирования коротких пептидов по фрагментации.

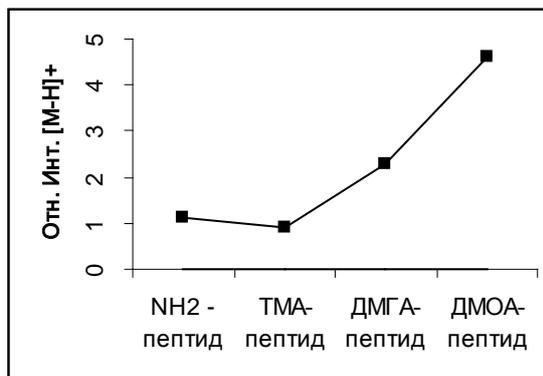


Для увеличения выхода продукта кватернизации использовали двухстадийную реакцию: ацилирование пептида хлорангидридом хлоруксусной кислоты с последующей обработкой триэтиламино; при этом хлорацетильный остаток алкилирует основание с образованием четвертичной аммониевой соли **1.10** [147] (экспериментальные детали в работе не приведены).



Такой подход оказался более продуктивным и затем использовался в различных вариантах [148–158]. Вместо триэтиламина использовали также триметиламин [148]. Вместо хлорацетилхлорида применяли ангидрид иодуксусной кислоты. Введение

заряженной группы, с одной стороны, увеличивает интенсивность сигнала в масс-спектре, а с другой стороны – уменьшает поверхностную активность молекулы, что способствует уменьшению интенсивности сигнала из-за увеличения гидрофильного характера пептида. Для разрешения этого противоречия авторы предложили использовать гидрофобные фрагменты в дериватирующих реагентах (триалкиламинах) для увеличения поверхностной активности пептидов [149].

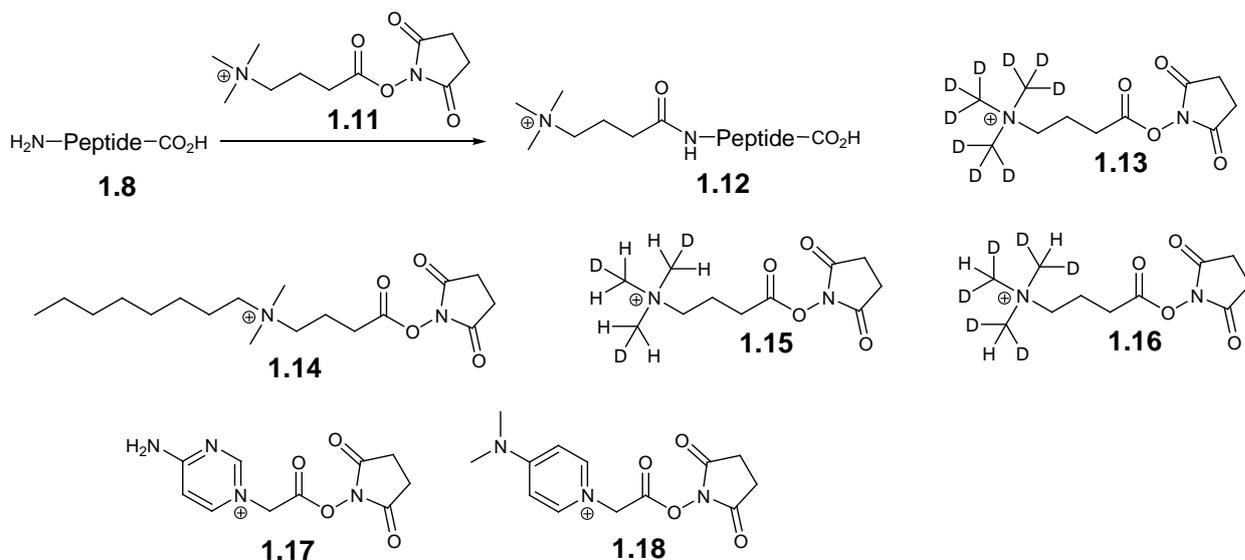


**Рис. 1.4** Относительная интенсивность сигналов  $[M-H]^+$  для недериватизированного пептида FGAKQA и продуктов его дериватизации триметиламином (TMA), диметилгексиламином (ДМГА) и диметилоктиламином (ДМОА) [149].

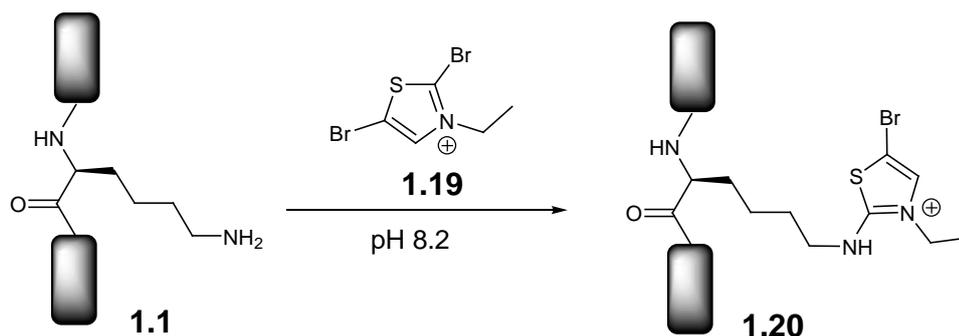
Как видно из рис. 1.4, наиболее интенсивный пик производного наблюдается в случае введения октильного радикала вместо метила. Возможно, ещё более гидрофобные модификации могли бы показать лучшие результаты, однако их использование ограничено плохой растворимостью полученного продукта в воде [149]. Отмечается, что проведение реакции с иодуксусным ангидридом при pH 6 позволяет селективно модифицировать терминальные аминокетильные группы пептидов в присутствии боковых аминокетильных остатков лизина [149, 152]. Разумеется, при работе с производными галогенуксусных кислот цистеиновые остатки в пептиде должны быть защищены, чтобы избежать их алкилирования. Этот метод введения положительного заряда применим и для синтетических пептидов: ацилирование и кватернизацию проводят прямо на твердофазной подложке [155, 156]. В работе [157] авторы сообщают о тысячекратном увеличении предела детекции пептида при использовании в качестве дериватирующих агентов четвертичных солей триэтиламина и 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (DABCO). Благодаря использованию nano-LC-ESI-MRM технологий удалось детектировать вещества в субфемтомольных количествах. Кроме триэтиламина, для кватернизации на твёрдой фазе использовали трипропиламин, трибутиламин [155] и DABCO. Пик продукта дериватизации виден даже при исследовании нескольких фемоль вещества [155, 156]. Кроме того, в статье [158] утверждается, что помимо улучшения предела детекции, использование бициклических четвертичных аммониевых меток на основе DABCO и

АВСО позволяет работать с модифицированными пептидами прямо в физиологическом буфере без предварительного обессоливания.

Четвертичный аммониевый катион можно сразу вводить в пептиды ацилированием аминогруппы активированным эфиром соответствующего реагента [159–163]. Массу метки можно регулировать как длиной алкильных заместителей при азоте (например, октильное производное **1.14** [162]), так и с помощью стабильных изотопов: активированный эфир **1.11** был также получен в виде дейтерий-модифицированных соединений **1.13** [161], **1.15** и **1.16** [163].



Следует отметить также несущие постоянный заряд ароматические производные **1.17** и **1.18**, использовавшиеся для улучшения детекции *N*-концевых *c*-фрагментов в МС-секвенировании пептидов [164].

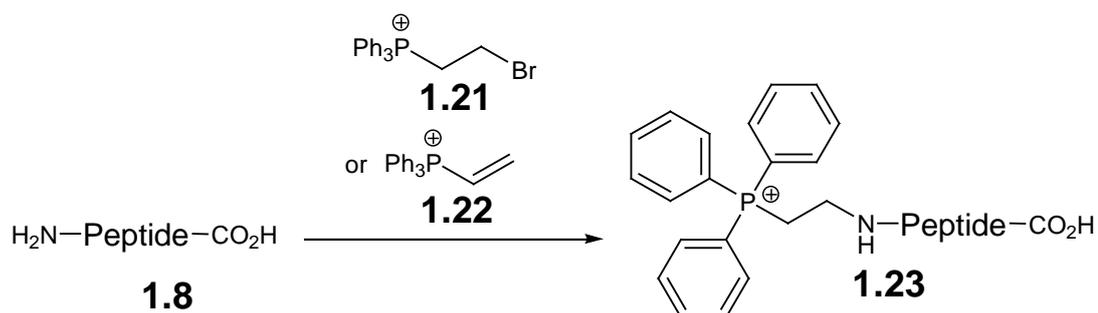


2,5-Дибром-3-этилтиазолий **1.19** алкилирует (гетероарилуирует) преимущественно  $\epsilon$ -аминогруппы остатка лизина, хотя в незначительной степени наблюдалась реакция по терминальным аминогруппам пептидов и фенольному кислороду остатка тирозина [165]. В образующемся производном **1.20** наряду с постоянным положительным зарядом присутствует атом брома. Это облегчает интерпретацию масс-спектрометрических

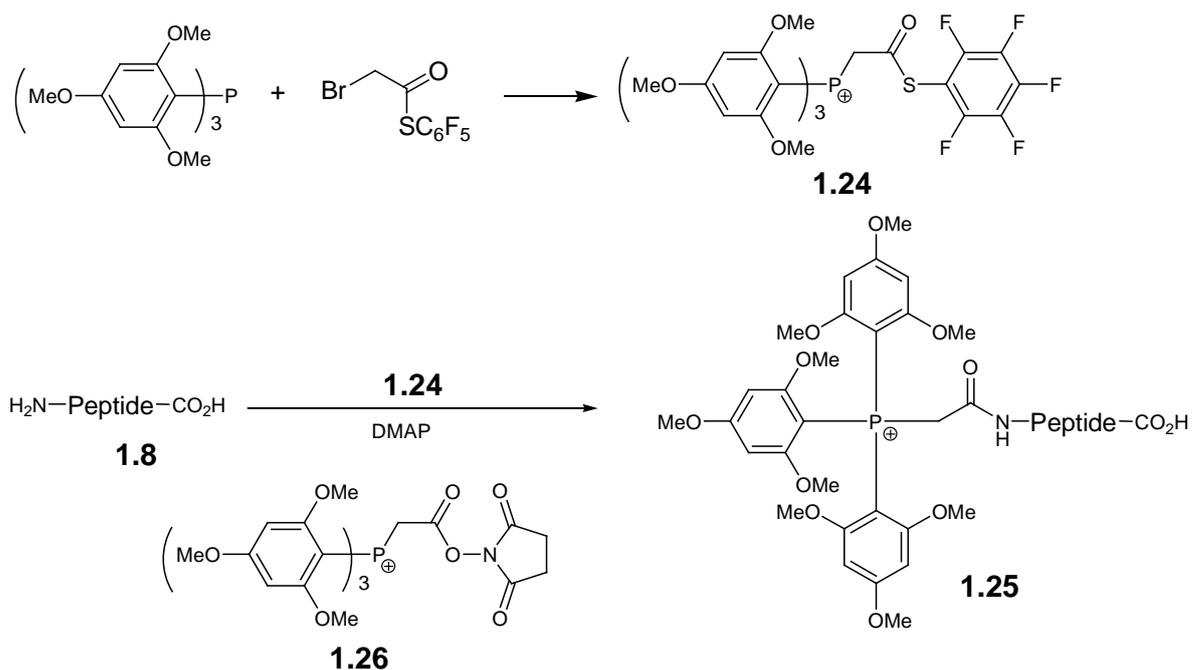
данных в МС/МС из-за характерного изотопного распределения, обусловленного соотношением изотопов  $^{79}\text{Br}$  и  $^{81}\text{Br}$ .

### 1.1.1.1.3 Четвертичные фосфониевые катионы

Триарилалкильные четвертичные фосфониевые соли представляют собой стабильные вещества, поэтому идея применить их производные в качестве ионогенных меток для пептидов выглядит логичной. В первых публикациях описано *N*-алкилирование пептидов трифенил-2-бромэтилфосфонием **1.21** или трифенил-винил-фосфонием **1.22** с образованием фосфониевых производных **1.23** [132, 166–168]. Они усиливают специфичную фрагментацию в МС-секвенировании пептидов.



В 1997 г. были введены в обиход и затем активно использовались реагенты на основе алкил-трис(2,4,6-триметоксифенил)фосфония (TMPP) [169–196]. Первым описанным реагентом был активированный эфир **1.24**, полученный взаимодействием трис(2,4,6-триметоксифенил)фосфина с *S*-пентафторфениловым эфиром бромтиоуксусной кислоты [169, 170]. Реагент **1.24** стабилен в ацетонитрильном растворе и в течение 15 мин реагирует с пептидами в присутствии 4-диметиламинопиридина с образованием производных **1.25**.



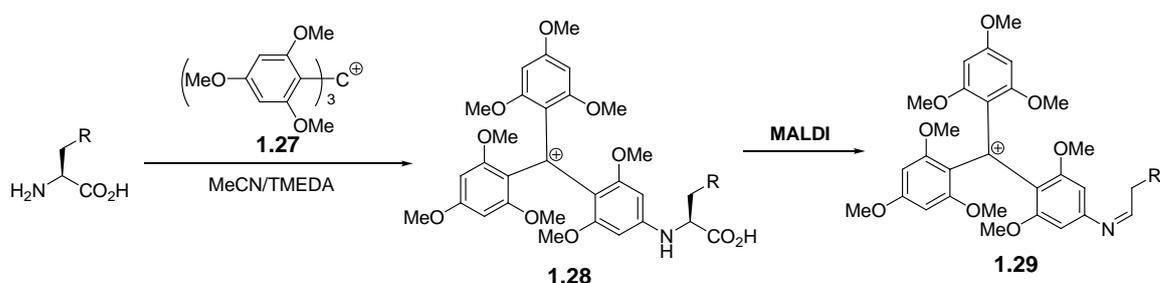
Меченые пептиды легко детектируются в пикомольных количествах в методе MALDI. Затем был получен оксисукцинимидный эфир **1.26**. Поскольку он менее активен, чем реагент **1.24**/DMAP, то при pH 8 оказалось возможно провести дериватизацию триптических пептидов по терминальной аминогруппе, не затрагивая боковую аминогруппу остатка лизина [171]. В дальнейшем были разработаны приёмы, позволяющие осуществлять масс-спектрометрическое секвенирование *N*- [179] или *C*-концевых [180] пептидов в продуктах гидролиза белков энтеропептидазой. При *N*-терминальной модификации активированным эфиром ТМРР присутствие в пептиде аргинина затрудняет фрагментацию, поэтому после дериватизации предложено проводить ферментативный гидролиз (с помощью пептидил-аргинин-дезаминазы) аргинина в цитруллин [185]. Для улучшения фрагментации ТМРР-меченых аргининсодержащих пептидов предложено также использовать фотодиссоциацию при облучении на длине волны 157 нм [188]. Реагент **1.26** также получен в изотопно-меченом варианте; при этом девять атомов углерода метоксильных групп заменены на изотоп  $^{13}\text{C}$ . *N*-Терминальное мечение белков проводят как реагентом **1.26**, так и его «тяжёлым» вариантом  $^{13}\text{C}_9$ -ТМРР, что позволяет после трипсинолиза автоматизировать идентификацию *N*-концевых пептидов [190].

Метку ТМРР использовали для *N*-концевого мечения и выделения пептидов при поиске и идентификации белков в клетках морской бактерии *Roseobacter denitrificans*. [191, 192]. Этот модельный объект используется для демонстрации подхода к аннотированию последовательностей, находящихся в базах данных (удалось идентифицировать *N*-концы 269 белков). Для выделения ТМРР-модифицированных пептидов использовали иммобилизованные на магнитные частицы антитела к ТМРР [191].

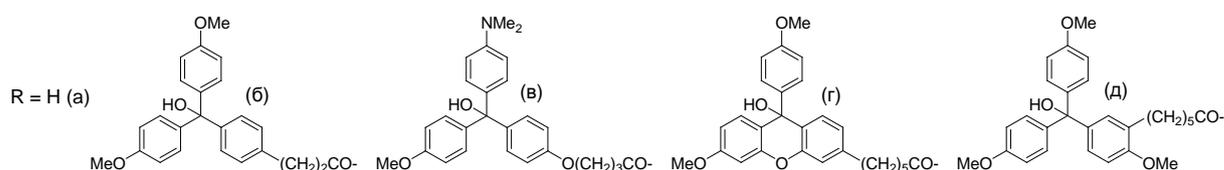
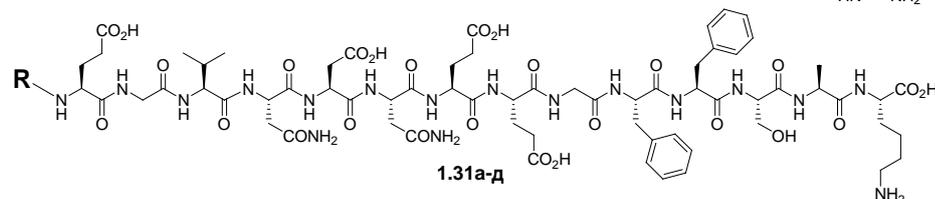
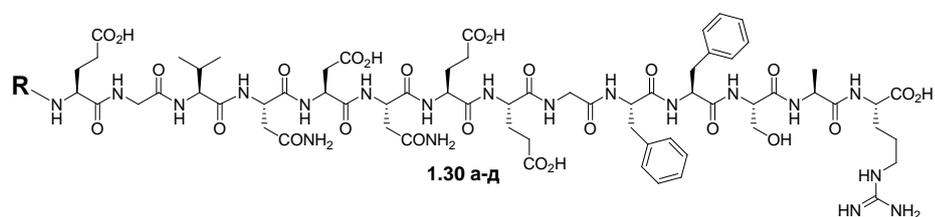
Кроме того, с помощью ТМРР [193] можно метить остатки *N*-концевых аминокислот для масс-спектрометрического определения последовательностей рекомбинантных моноклональных антител, что помогает упростить процедуру их идентификации.

#### 1.1.1.1.4 Триарилметильные катионы

Катион трис(2,4,6-триметоксифенил)метилия **1.27** способен реагировать с аминами с последовательным замещением метоксигрупп в пара-положениях фенильных колец [198–200]. Тетрафторборат катиона **1.27** использовали как реагент **1.26** для ионогенной дериватизации аминокислот [201]. Реакцию проводили при комнатной температуре в ацетонитриле в присутствии TMEDA. Наряду с основными продуктами модификации **1.28** в MALDI масс-спектрах детектировались продукты элиминирования  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ .



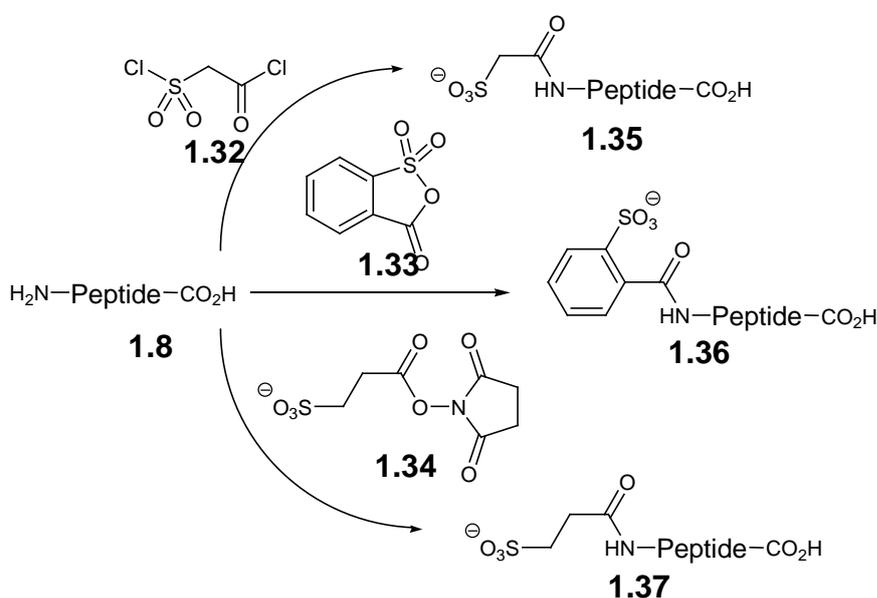
Триарилметанола с лёгкостью отщепляют гидроксил в условиях MALDI и детектируются в виде соответствующих катионов. Для проверки влияния модификации различными тритильными катионами на интенсивность пиков в MALDI MS твердофазным методом были синтезированы пептиды **1.30a** и **1.31a**, а также их тритильные производные **1.30б-д** и **1.31б-д** [202]. Пептиды **1.30a** и **1.31a** различаются C-концевой аминокислотой (аргинин или лизин), и, таким образом, могут служить моделями триптических пептидов.



Оказалось, что модификация аргининсодержащего пептида **1.30a** каждым из тритилов (б-д) усиливает интенсивность его пика в MALDI, причём эффект сильнее выражен для производных **1.30б** и **1.30г**. Для лизинсодержащего пептида картина иная: лишь пики веществ **1.31в** и **1.31г** оказались большей интенсивности, чем у исходного **1.31a**. Природа такого различия не ясна. Интересно, что после изотопной деконволюции пик пептида **1.30б** представлял собой двойной сигнал с разницей масс 1 Да –  $[\text{M}-\text{OH}]^+$  и  $[\text{M}-\text{OH}+\text{H}]^+$  (пики всех остальных пептидов соответствовали  $[\text{M}-\text{OH}]^+$ ). Авторы предполагают, что одновременно детектируются две формы положительно заряженного пептида **1.30б**: форма с положительным зарядом на тритильном катионе с нейтральным аргинином и форма с протонированным аргинином и электронейтральным тритильным радикалом. В результате, модификация производным тританола (б) может служить удобным методом детекции присутствия в пептиде аргинина [202].

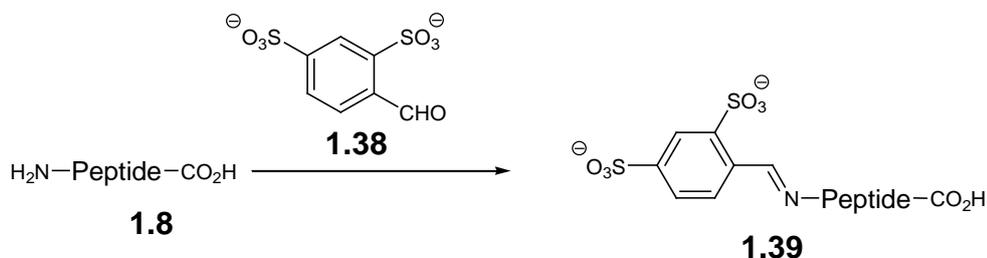
### 1.1.1.1.5 Модификация анионами

Для введения в пептиды постоянного отрицательного заряда предложено ацилирование по терминальной аминогруппе реагентами **1.32** или **1.33** [203]. Продуктами реакции оказываются содержащие сульфогруппу пептиды **1.35** и **1.36** (схема 1.1). Такая модификация улучшает фрагментацию триптических пептидов и облегчает их МС-секвенирование. Недостаток этого метода – чрезвычайно высокая реакционная способность модифицирующих реагентов, особенно соединения **1.32**. Поэтому впоследствии для этих целей был разработан мягкий реагент **1.34**, активированный эфир 3-сульфопропионовой кислоты, гораздо более устойчивый в водных растворах [204–206]. Продукты модификации **1.37** (Схема 1) легко секвенируются методом MALDI.



**Схема 1.1** Различные реагенты для введения в молекулу пептида отрицательного заряда.

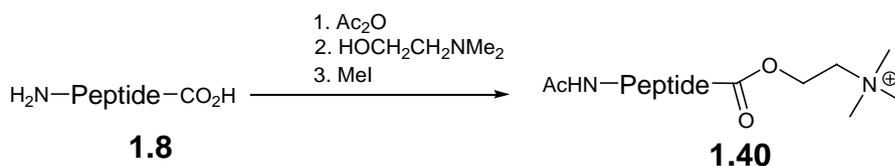
Недавно разработан ещё один метод введения в пептиды отрицательного заряда в результате модификации аминогруппы [207]. Альдегид **1.38**, несущий две сульфогруппы, образует с пептидами достаточно устойчивый в условиях MALDI-МС аддукт – основание Шиффа **1.39**.



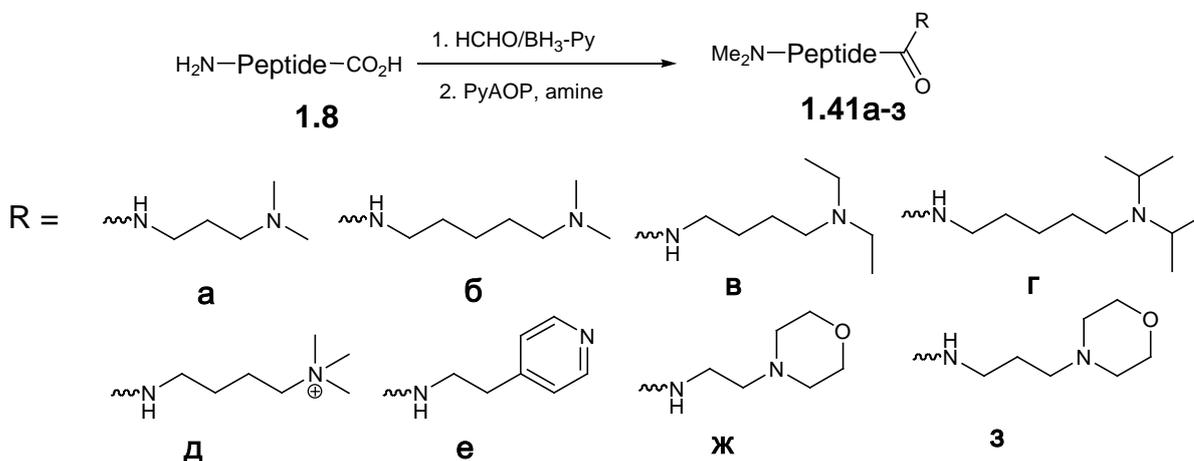
### 1.1.1.2 Модификация по карбоксильной группе

Модификация пептидов ионогенными группами по карбоксилу встречается гораздо реже. В одном из старых методов пептид *N*-ацилировали-*O*-активировали обработкой

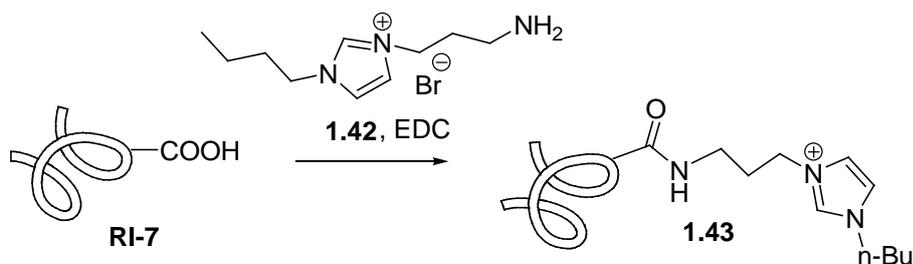
уксусным ангидридом, модифицировали (этерифицировали) диметиламиноэтанолом, а затем кватернизовали третичный амин метилиодидом, получая сложноэфирное производное **1.40** [208].

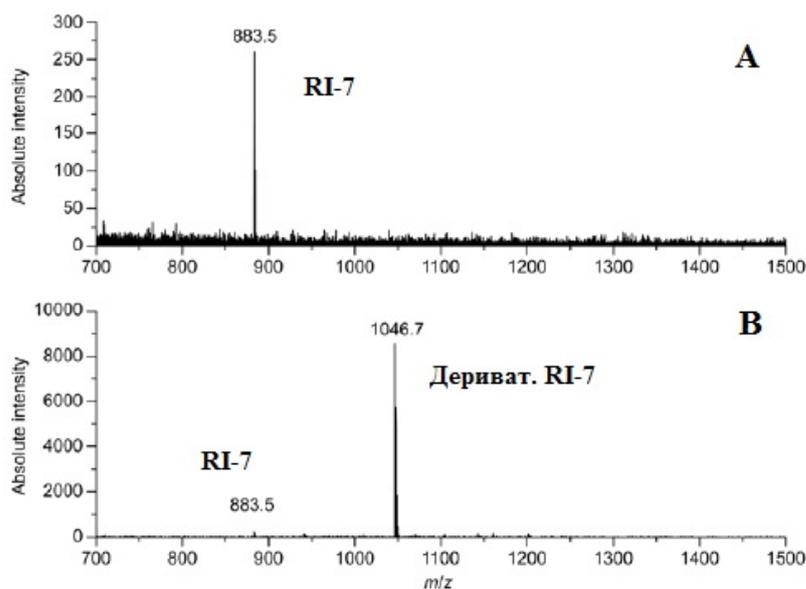


В другой работе аминогруппы пептидов защищали восстановительным аминированием, затем, активируя карбоксильные группы, вводили аминопроизводные третичных или четвертичных аминов [209]. Картину осложняет то обстоятельство, что в пептидах **1.41a-з** оказываются модифицированными не только С-терминальные карбоксильные группы, но и все боковые карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот.



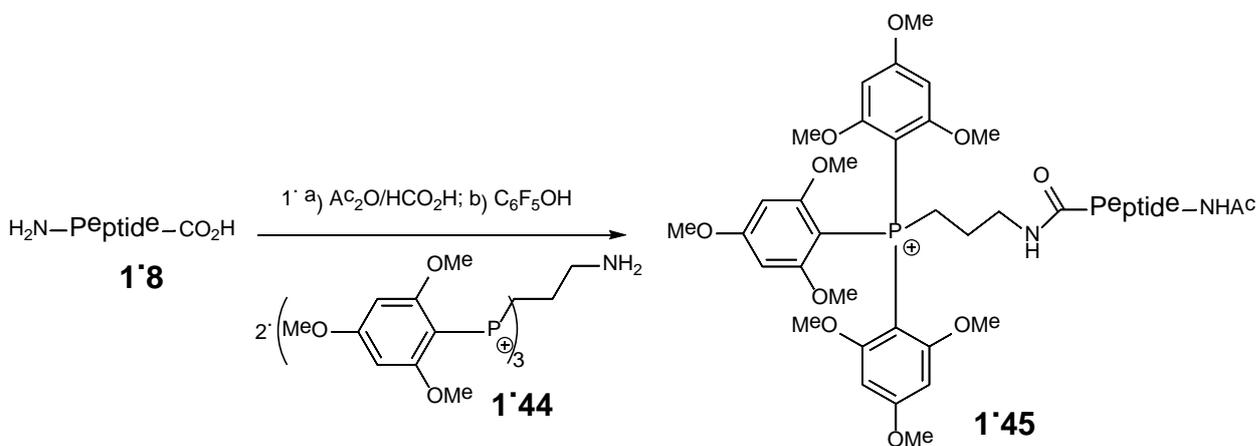
Для модификации синтетического гептапептида RVYVHPI (**RI-7**) использовали аминоалкильное производное имидазолия **1.42** в присутствии конденсирующего реагента [210]. Интенсивность сигнала дериватизированного производного **1.43** на порядок выше интенсивности немеченого пептида (рис. 1.5), однако, следует отметить, что для модификации выбран пептид, содержащий лишь терминальную карбоксильную группу (без аспарагиновой и глутаминовой кислоты).



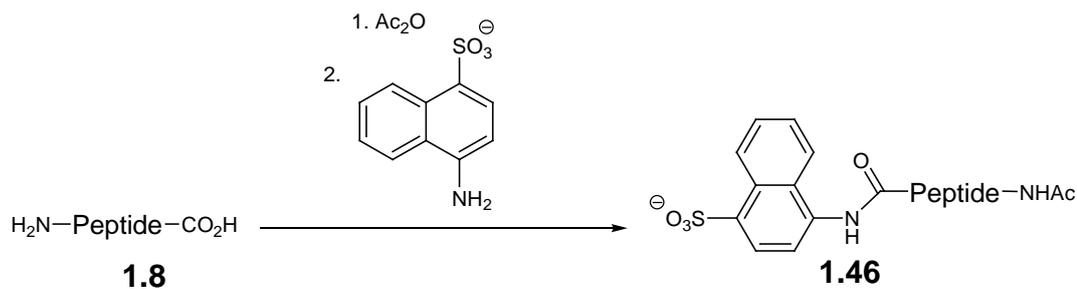


**Рис. 1.5.** (А) спектр MALDI-МС пептида **RI-7**, (В) спектр MALDI-МС эквимольярной смеси пептида **RI-7** и его производного **1.43**.

Аминопропильное производное ТМРР **1.44** применяли для *C*-терминального мечения пептидов [211–213]. Активация уксусным ангидридом в муравьиной кислоте приводит к *C*-концевому оксазолону, который далее реагирует с пентафторфенолом, образуя активированный эфир. Последний взаимодействует с амином **1.44** с образованием производных **1.45**, которые использовали для МС-секвенирования пептидов.

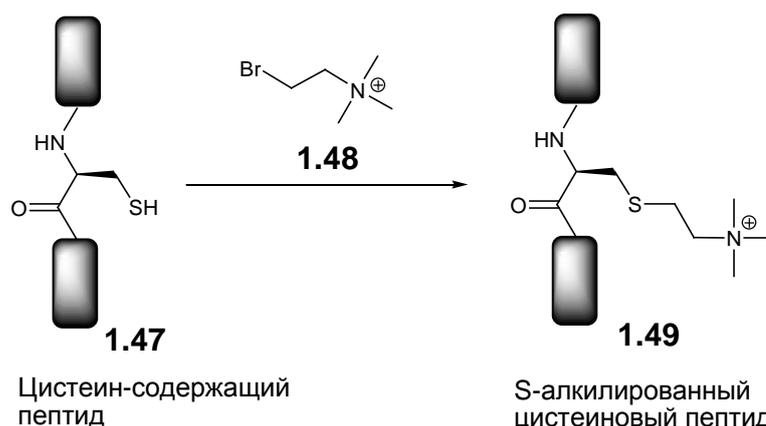


Для введения по карбоксильной группе отрицательного заряда активированное производное пептида обрабатывали 4-аминонафталинсульфокислотой и получали модифицированный пептид **1.46** [214, 215].

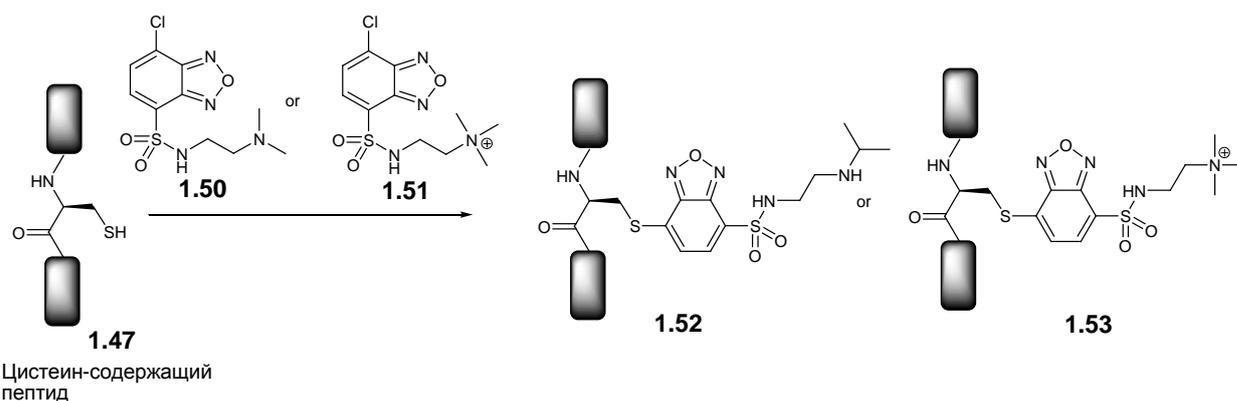


### 1.1.1.3 Модификация по тиольной группе

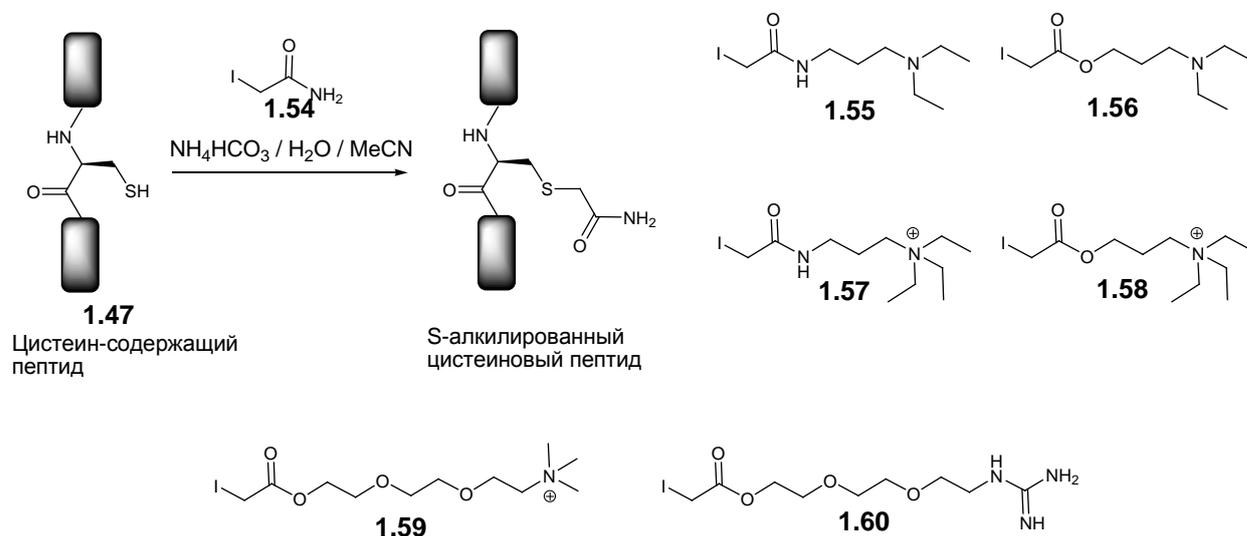
Большинство известных белков и пептидов содержат остатки цистеина. Цистеин легко алкилируется различными ионогенными реагентами. Например, при взаимодействии меркапто-группы цистеинового остатка пептида **1.47** с бромалкильным производным четвертичного аммониевого катиона **1.48** образуется структурный аналог кватернизованного остатка лизина **1.49** [133]. Такую модификацию в комбинации с гуанидилированием боковой аминогруппы остатка лизина применяли для секвенирования пептидов.



Также предложен метод, заключающийся в алкилировании по тиольной группе остатка цистеина галогенпроизводными флуоресцентного гетероцикла 2,1,3-бензоксадиазола, несущими третичную аминогруппу (**1.50**) или четвертичную аммониевую группу (**1.51**) в боковой цепи. В результате образуются флуоресцентные пептидные производные **1.52** и **1.53** [216].



Алкилирование остатка цистеина по меркаптогруппе производными иодуксусной кислоты (например, иодацетамидом **1.54**) в слабощелочной среде хорошо изучено. Недавно появилось короткое сообщение [217], в котором производные иодуксусной кислоты масс-тагов, содержащих концевые третичные аминогруппы (**1.55**, **1.56**), четвертичные аммониевые группы (**1.57–1.59**) и остаток гуанидина (**1.60**), использовали для модификации цистеинсодержащих пептидов. Тиолсодержащие пептиды в среде вода/ацетонитрил за 45 мин полностью реагируют с избытком иодацетильного реагента; в MALDI масс-спектрах наблюдается увеличение интенсивности сигналов модифицированных таким образом пептидов (Таблица 1.1). Этот эффект, по-видимому, зависит как от катионогенных свойств тага (четвертичный аммоний > гуанидин >> третичный амин), так и от стабильности линкера в условиях MALDI (сложноэфирный >> амидный), хотя имеются и исключения.



**Таблица 1.1** Усиление сигналов в MALDI-МС пептидов, модифицированных с помощью катионных масс-тагов **1.55–1.60** (из данных работы [217]).

Цистеинсодержащий пептид	Относительная интенсивность сигнала в MALDI-МС при модификации реагентом						
	<b>1.54</b>	<b>1.55</b>	<b>1.56</b>	<b>1.57</b>	<b>1.58</b>	<b>1.59</b>	<b>1.60</b>
Insulin alpha <sup>1</sup>	1.0	44.2	58.0	18.5	121.1	222.5	167.7
Insulin beta <sup>1</sup>	1.0	6.4	28.2	4.4	58.1	58.3	30.8
NC4 <sup>2</sup>	1.0	1.2	3.0	1.3	25.8	33.5	12.4
S26C <sup>3</sup>	1.0	1.4	24.2	1.4	16.6	16.5	11.1

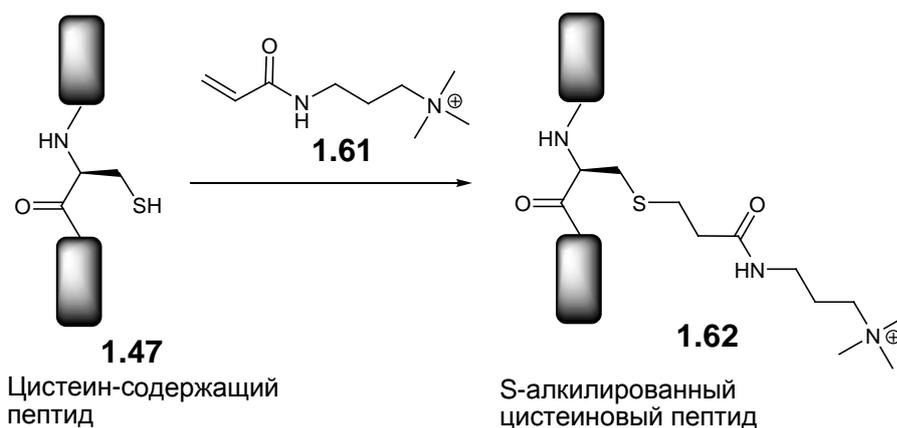
<sup>1</sup> Получены восстановлением дисульфидных связей в инсулине с помощью DTT.

<sup>2</sup> NC4 CLAC-P 641–654 collagen-like Alzheimer amyloid plaque component precursor.

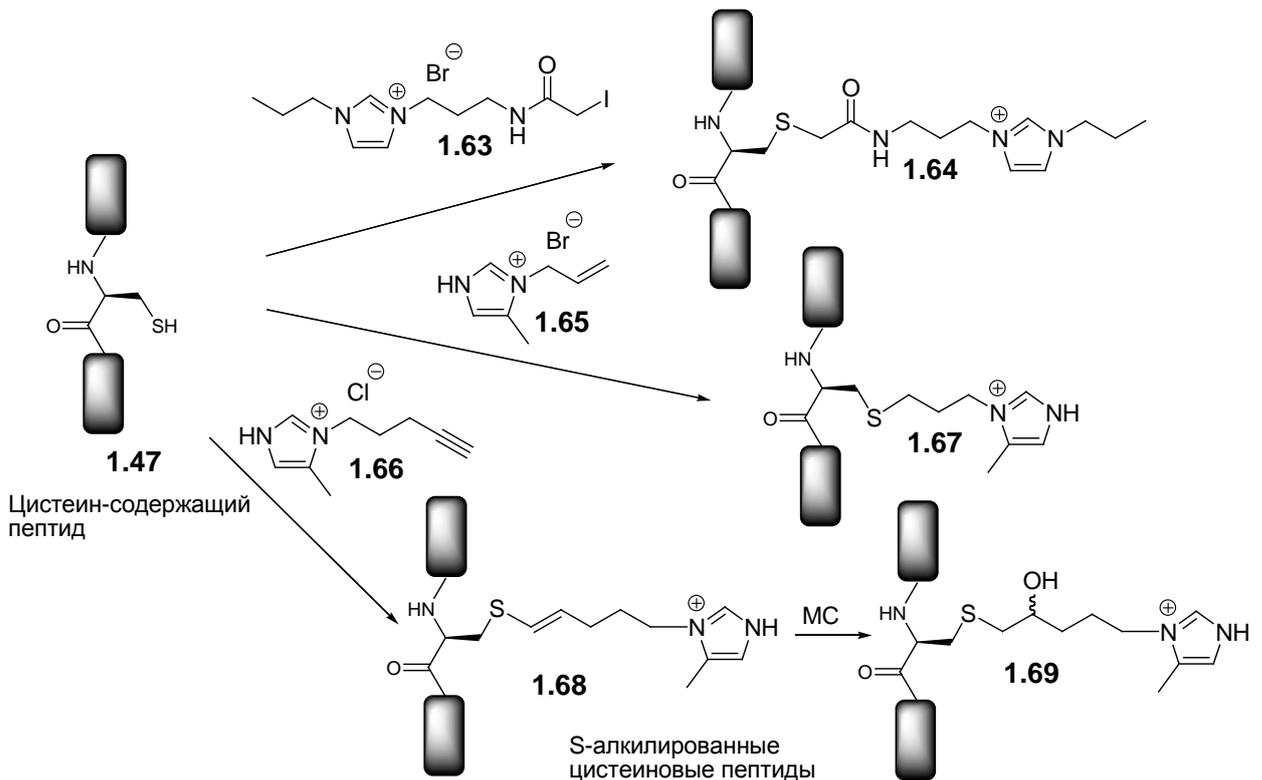
<sup>3</sup> S26C beta-amyloid 17–40.

Следует отметить гидрофильный характер используемых катионогенных групп, что, по мнению авторов, уменьшит потери за счет возможной сорбции гидрофобных пептидов, например, ассоциированных с болезнью Альцгеймера пептидов NC4 и S26C.

Наконец, сообщается об использовании акриламидного реагента **1.61** для алкилирования тиольных групп цистеиновых остатков, при этом образуется положительно заряженный фрагмент **1.62** [218]. Этот метод, по мнению авторов, позволяет распознать и охарактеризовать цистеинсодержащие пептиды с помощью МС.

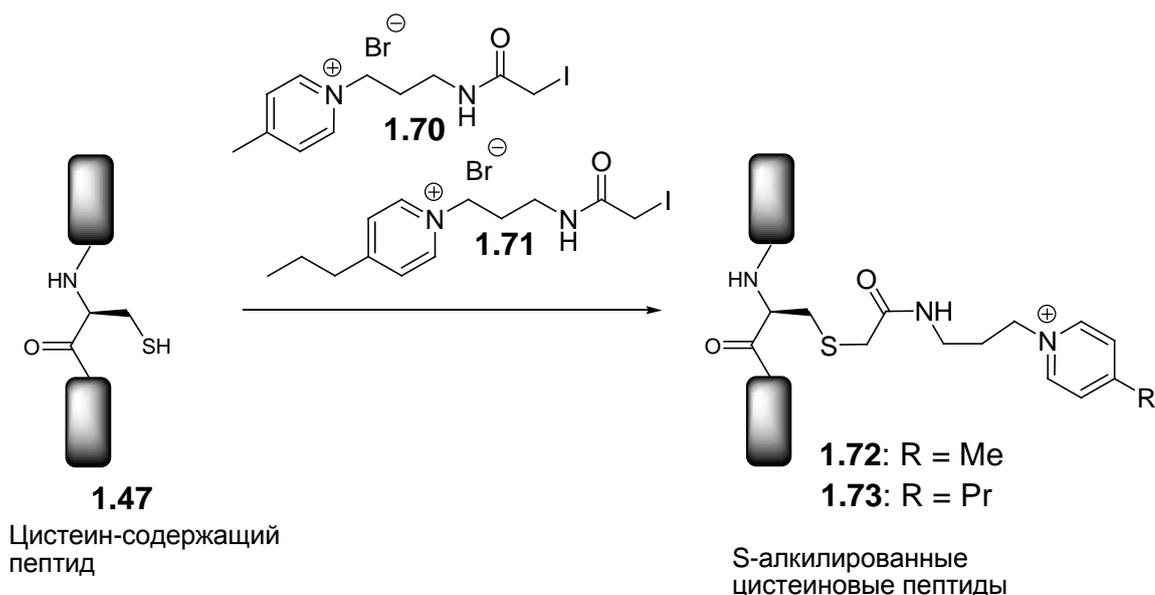


Ещё один подход к модификации по тиольной группе предложен авторами работы [219]. В качестве дериватирующего агента применяли производное катиона имидазолия **1.63**. Отмечается, что такая метка довольно стабильна, и модифицированные пептиды **1.64** могут храниться более недели при комнатной температуре, не претерпевая существенных изменений (судя по спектру MALDI-МС), а эффективность ионизации возрастает от нескольких десятков до нескольких сотен раз в зависимости от структуры исследуемого пептида. Причем подобный результат авторы наблюдали как в случае ионизации MALDI, так и в случае ионизации электрораспылением.

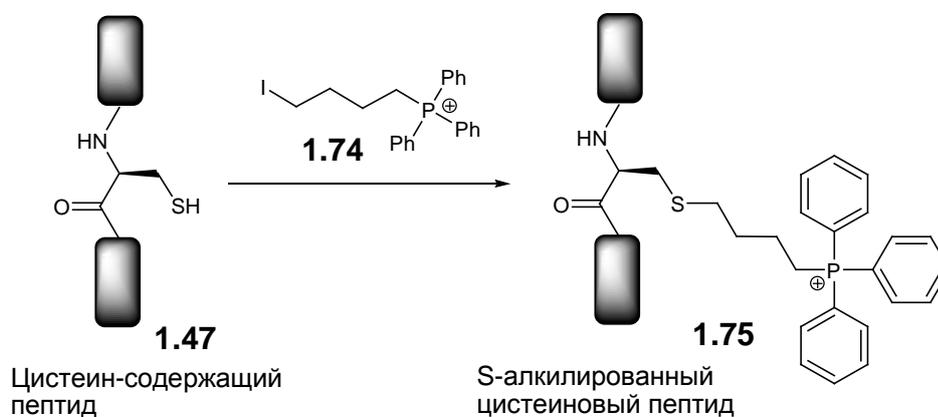


Имидазолиевые ионные жидкости **1.65** и **1.66** с пептидами образуют продукты алкилирования **1.67** и **1.68**, причём в фотоиндуцируемом процессе ( $\lambda$  320–360 nm) субстратами служат пептиды с дисульфидными группами (сдвоенными остатками цистеина) [220]. Такая дериватизация облегчает анализ спектров фрагментации в MALDI-МС. В спектрах дополнительно обнаруживается сигнал продукта гидратации **1.69**.

Пиридиниевые производные **1.70** и **1.71** использовались для дериватизации тиол-содержащих пептидов с последующей ESI-МС. Увеличение интенсивности сигналов продуктов **1.72** и **1.73** позволяет повысить эффективность идентификации тиол-содержащих пептидов из  $\alpha$ -трансферина. Сначала проводят восстановление дисульфидных связей с помощью ТСЕР, затем дериватизацию и далее – трипсинолиз [221].

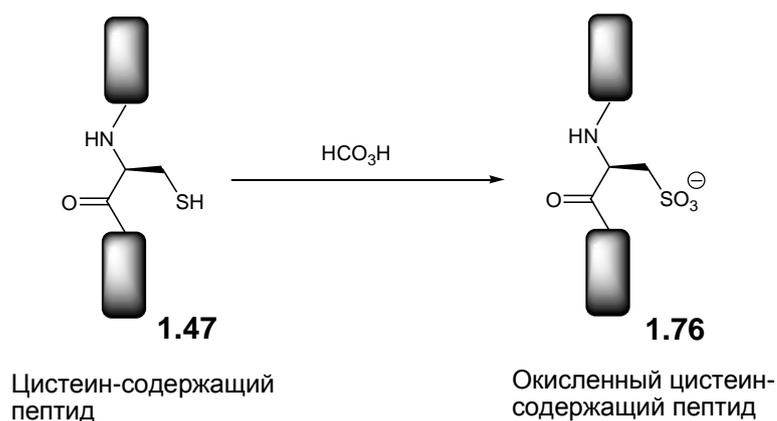


Введение в пептиды положительного заряда с помощью алкилирования тиольной группы производным четвертичного фосфониевого катиона было описано лишь однажды: иодакильный реагент **1.74** использовался для гладкого алкилирования цистеиновых остатков при pH 8.4 с образованием положительно заряженного фрагмента **1.75** [222]. Этот подход может служить ценным дополнением в ряду методов масс-спектрометрической характеристики цистеинсодержащих пептидов.



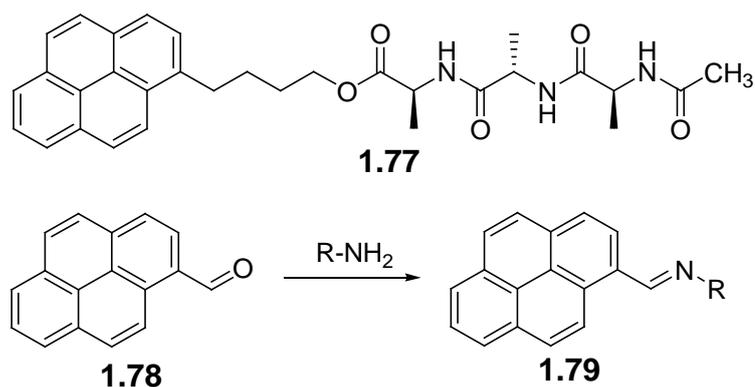
Авторы подчеркивают «высокую степень мечения» и стабильность модифицированных пептидов. Как в случае исследований методом MALDI-МС, так и в случае ионизации электрораспылением наблюдалось увеличение эффективности ионизации в десятки раз по сравнению с ранее использовавшимся для этих целей иодацетамидом.

Для анионной модификации по тиольной группе остатка цистеина применяли её окисление надмуравьиной кислотой в соответствующий сульфат **1.76** [223–225].



#### 1.1.1.4. Другие подходы (модификация ПАУ)

Следует упомянуть ещё один интересный подход. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) а) достаточно инертны в условиях различных реакций, б) хорошо поглощают электромагнитное излучение в УФ-области (куда попадает излучение лазеров в MALDI) и легко детектируются в масс-спектрах из-за своей липофильности и способности терять электрон с образованием катион-радикала. Поэтому было предложено использовать производные пирена как масс-метки для детекции протекания реакций и для поиска новых реакций [226]. Одной из модельных реакций было получение пиренового производного трипептида **1.77**. Отсюда возникла идея использовать 1-формилпирен **1.78** для дериватизации аминов и, в частности, пептидов. Однако пептидные производные **1.79** неожиданно показали в масс-спектре сигнал  $[M+44]^+$ , что, по мнению исследователей, может означать присоединение к аддукту **1.79** молекулы  $\text{CO}_2$  [227].



Таким образом, масс-спектрометрические метки широко используются для анализа белков и пептидов, и всё чаще становятся важным инструментом в протеомике. Они существенно повышают чувствительность детекции, облегчают работу по анализу и интерпретации масс-спектров, а также способствуют получению дополнительной информации о структуре анализата. Несмотря на большое количество предложенных структур, можно выявить общую закономерность в дизайне ионогенных масс-спектрометрических меток: ядро метки составляет стабильный карбокатион, либо

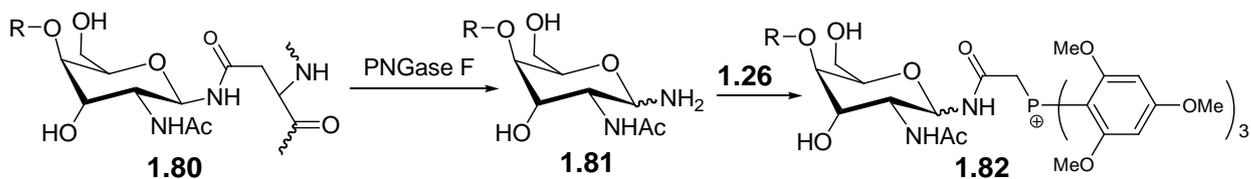
легкоионизируемая молекула, как правило, вторичные, третичные амины, кватернизованные аммониевые и фосфониевые производные и различные азотсодержащие гетероциклические соединения, которые алкильным линкером соединены с реакционноспособными функциональными группами (*N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый активированные эфиры, иодацетамид и т.п.). С помощью такого линкера происходит дериватизация исследуемых пептидов и белков, а непосредственно ядро масс-спектрометрической метки, содержащее перманентный (или легко приобретаемый) заряд, улучшает физико-химические характеристики молекулы в процессах ионизации и детекции в МС.

### 1.1.2 Детекция углеводов

В последние годы сильно возросло число исследований в области структуры и функции углеводов, поскольку гликозилирование оказывается важнейшим процессом в живых клетках - пост-трансляционной модификацией белков. Структурные изменения гликопротеинов связаны с такими серьезными патологическими процессами, как развитие опухолей и метастазы. Несмотря на то, что существует много методов анализа полисахаридов, актуальной является задача разработки новых подходов для решения проблем гликобиологии. Именно развитие инновационных, высокочувствительных масс-спектрометрических методов позволило достичь успехов в этой области. Так, число публикаций по использованию MALDI-МС для анализа углеводов с 1995 года растет экспоненциально [228]. Дериватизация служит полезным инструментом, позволяющим повысить чувствительность анализа, и сделать менее сложной «картину фрагментации», упрощая тем самым структурный анализ исследуемых соединений. Поскольку масс-спектрометрическому исследованию углеводов посвящен ряд обзоров [113, 228–234], мы ограничимся несколькими примерами использования ионогенных масс-меток.

#### 1.1.2.1. Модификация по аминокгруппе

Свободная аминокгруппа достаточно редко встречается в молекулах углеводов (за исключением аминокгликозидных антибиотиков). Но иногда удаётся получить аминоксодержащее углеводное производное и провести его дериватизацию. Например, ферментативный гидролиз *N*-связанных с пептидами гликанов **1.80** (с помощью ПНГазы F) приводит к аминоксодержащим **1.81**, которые *in situ* модифицируют активированным эфиром **1.26** и детектируют в MALDI-МС в виде производных **1.82** [235].



Аналогичный подход применялся в работе [236]. Были получены кислоты **1.83** и **1.84**, а также хлорангидрид **1.85**, которые использовались для дериватизации аминокислот (рис. 1.6), также полученных ферментативным гидролизом пептидогликанов.

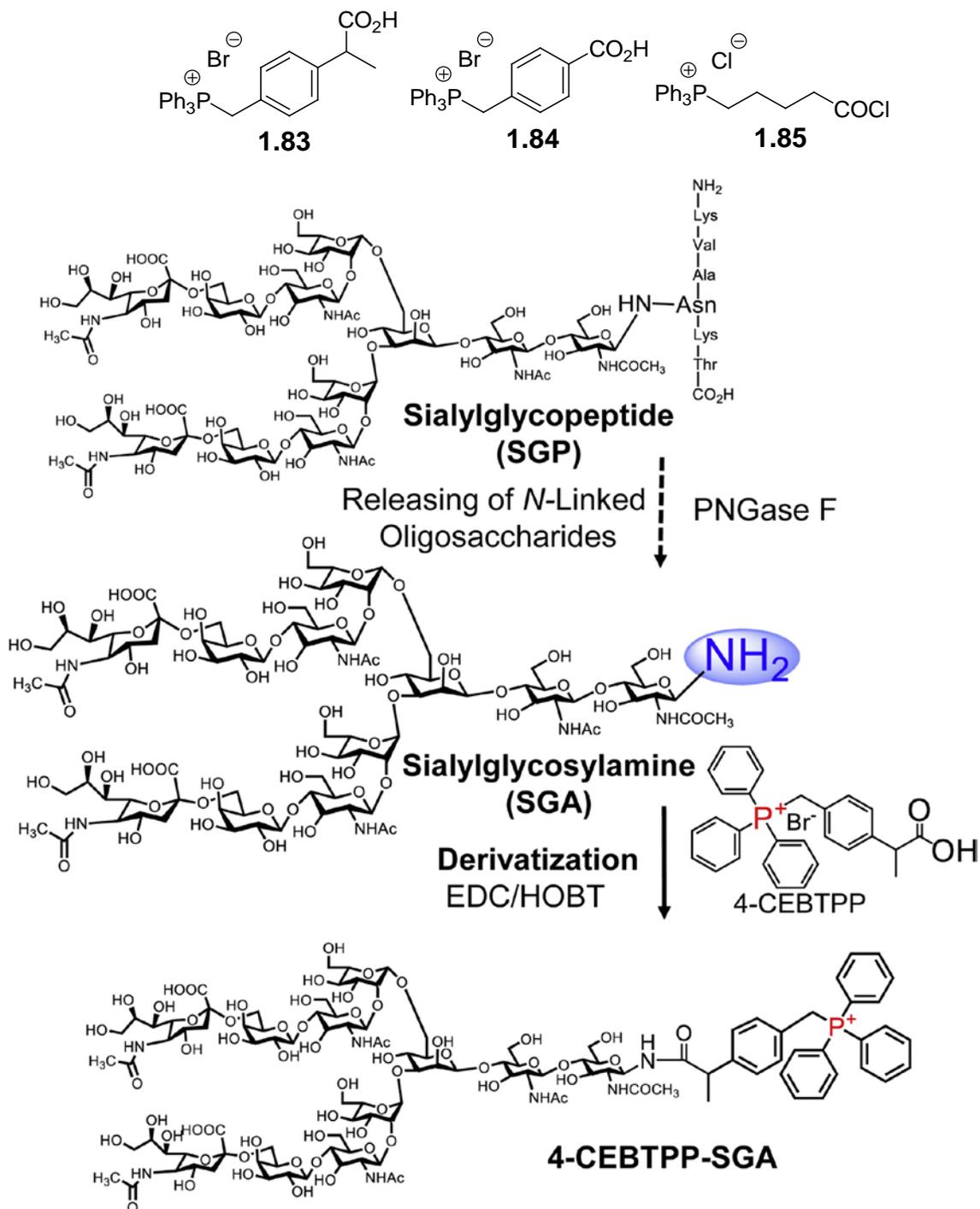


Рис. 1.6 Дериватизация гликана фосфониевым реагентом **1.83** [236].

Использование таких реагентов позволяло не только с высокой чувствительностью (LOD 30 фмоль) детектировать различные олигосахариды, но и осуществлять их одновременный структурный анализ с помощью LC/MS-MS (рис. 1.7). Дериватизация позволяет получать молекулярные ионы разделяемых ВЭЖХ компонентов, а затем анализировать их по отдельности, варьируя энергию вторичной фрагментации/ионизации для получения характеристичного набора фрагментов. Таким образом была определена структура разветвлённых гликанов, содержащих до 14 углеводных остатков. В целом метод весьма перспективен, так как для анализа требуется малое количество вещества [236].

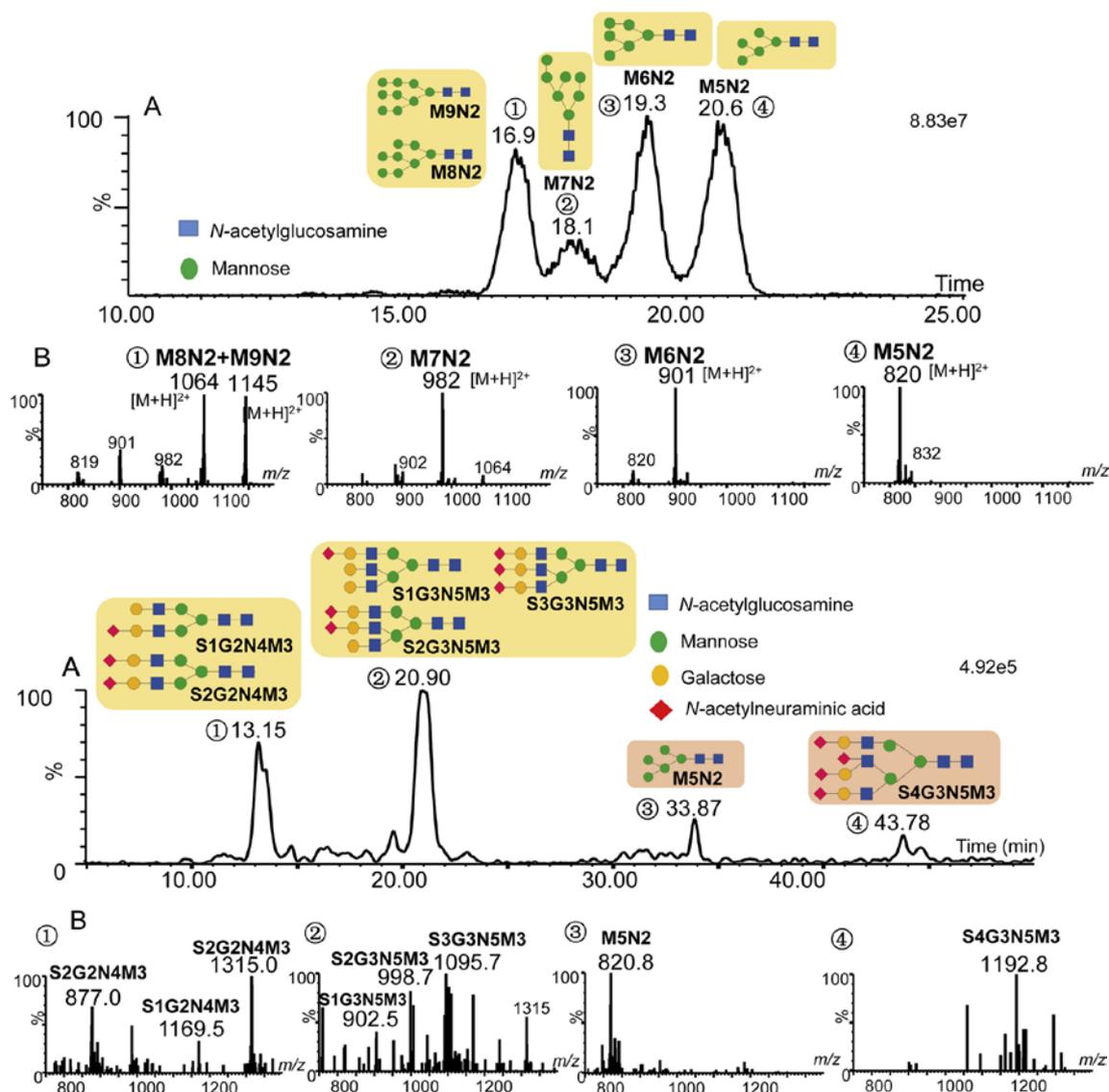
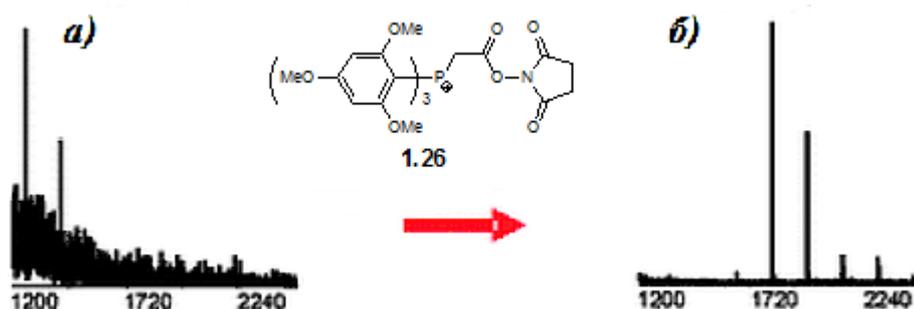


Рис. 1.7 LC/MS анализ олигосахаридов, модифицированных фосфониевым реагентом **1.83** [236].

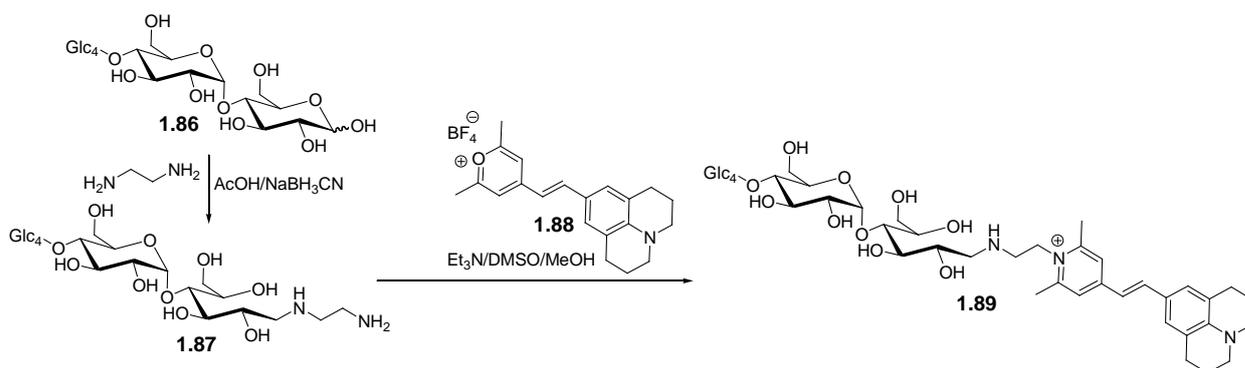
Пригодную для дериватизации аминогруппу можно вводить в молекулы углеводов различными способами. Один из них заключается в превращении гликозидного гидроксила в аминогруппу (реакция Кочеткова [237]). К сожалению, реакция Кочеткова требует выдерживания углевода в насыщенном растворе гидрокарбоната аммония в

течение 5 дней. Для решения этой проблемы было предложено проводить её под действием микроволнового излучения при перемешивании, что позволило сократить время реакции до 90 мин [238]. Для дериватизации полученных аminosахаров использовали (уже знакомый нам) модифицирующий агент **1.26**. Как видно на рис. 1.8, дериватизация заметно улучшала соотношение сигнал/шум в масс-спектре, а также существенно увеличивала предел обнаружения аналита – до 2 фмоль/мкл.



**Рис. 1.8** Спектр MALDI-МС а) мальтогептозы (500 фмоль) б) дериватизированной мальтогептозы (50 фмоль) [236].

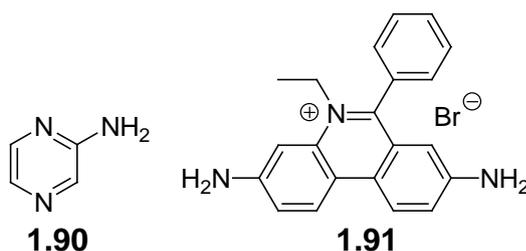
На практике для введения аминогруппы проще применять реакцию восстановительного аминирования карбонильной группы. Например, олигосахарид **1.86** обрабатывали этилендиамином в уксусной кислоте в присутствии цианоборгидрида [239]. Полученное аминопроизводное **1.87** функционализировали пирилиевой солью **1.88**. В результате получено *N*-алкилпиридиновое производное **1.89**, несущее перманентный положительный заряд; кроме того, модификация является флуоресцентным красителем. Наличие заряда даёт возможность анализировать подобные производные олигосахаридов также с помощью капиллярного электрофореза [239].



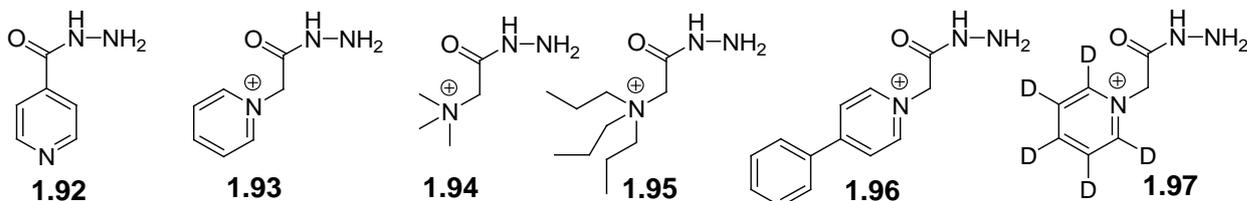
### 1.1.2.2. Модификация по карбонильной группе

Для одностадийной модификации карбонильной группы в углеводах ионогенными группами использовались различные методы. Аминопиразин **1.90** [240] и этидийбромид **1.91** [241] способны реагировать с карбонильной группой углеводов с образованием оснований Шиффа, которые и детектируются с помощью МС. Продукты дериватизации

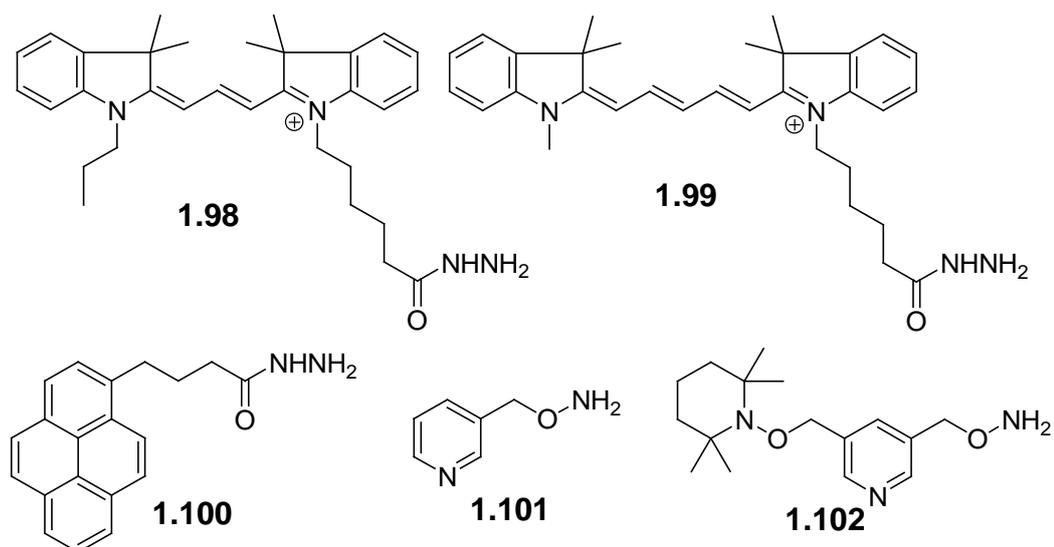
детектируются с большей чувствительностью и пригодны для дальнейшего структурного анализа с помощью MS-MS из-за их более чёткой фрагментации.



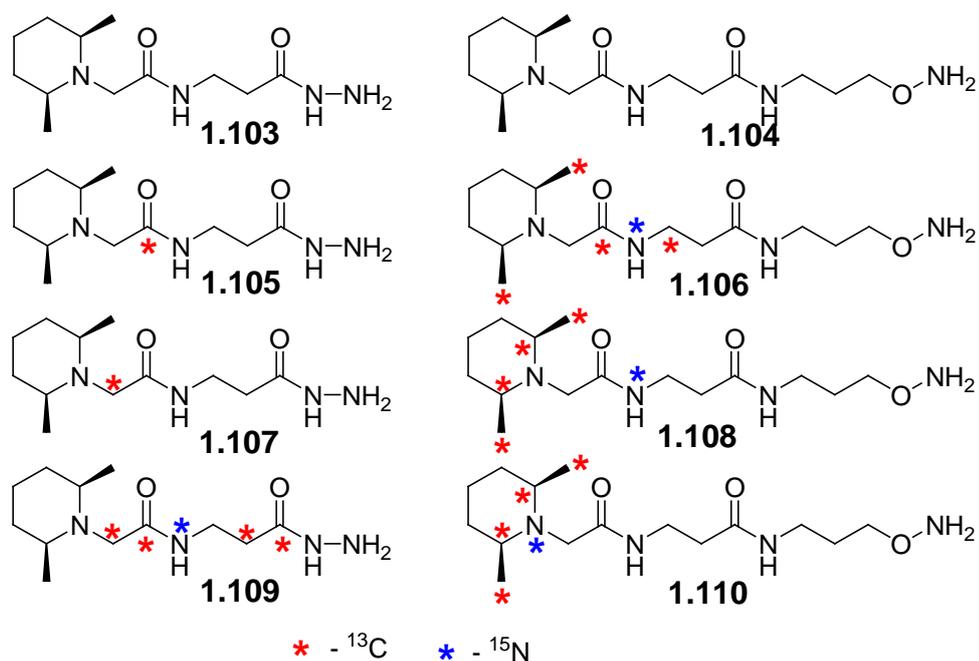
Поскольку карбонильные соединения способны легко реагировать с гидразидами кислот, подобные реагенты также используются для дериватизации углеводов. Среди таких реагентов следует упомянуть изониазид **1.92** [242], реагенты Гирарда Р **1.93** [243] и Т **1.94** [244–247], в том числе их производные **1.95** и **1.96** [247], а также дейтерированный аналог **1.97** [248]. Такие модификации в несколько раз увеличивают чувствительность детекции восстанавливающих моно- и олигосахаридов, особенно в сложных смесях.



Определение гликанов с помощью реагента **1.93** проводили на хорошо изученных гликопротеинах – бычьим фетуине, иммуноглобулине и сыворотке крови человека [243]. На первой стадии свободные карбоксильные группы гликопептида нейтрализовали ацетогидразидом в присутствии конденсирующего реагента. Амидирование карбоксильной группы в сочетании с введением постоянного положительного заряда позволило значительно повысить чувствительность метода (LOD 0.5 пмоль/на ячейку мишени), а также его линейный коэффициент корреляции, что делает метод пригодным для количественного определения аналитов. Для контроля содержание этих же соединений было определено методом УЭЖХ. Результаты обоих анализов совпали. Из основных преимуществ метода стоит выделить: 1) отсутствие необходимости в хроматографической очистке аналитов, 2) возможность анализировать *in situ* как нейтральные, так и сиаловые (сиалированные) гликаны, 3) экспрессность анализа, нетрудоемкий процесс пробоподготовки, что открывает возможности его автоматизации [243].



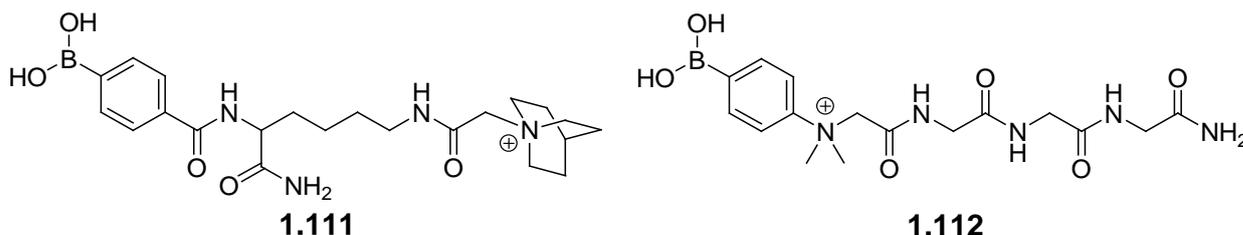
Гидразиды цианиновых красителей  $Cy_3$  **1.98** и  $Cy_5$  **1.99** легко реагируют с олигосахаридами и усиливают сигналы молекулярных ионов в MALDI-MS в 500 раз, значительно превосходя в этом компоненте дериватизацию реагентом Гирарда **1.94**. Цианиновые красители гидрофобны, обладают интенсивным поглощением в видимой области и яркой флуоресценцией, что может быть использовано для выделения продуктов дериватизации [249]. Модификация сульфатированных олигосахаридов гидразидом пиренилбутановой кислоты **1.100** приводит к лучшему разрешению спектра в режиме отрицательных ионов [250]. Наконец, гидросиламиновые производные **1.101** и **1.102** разработаны для масс-спектрометрического определения структуры гликанов [251]. Дериватизация реагентом **1.101** эффективна для кислотного пути деградации олигосахаридной цепи, а модификация реагентом **1.102** приводит к радикальному пути фрагментации.



Для модификации карбонильных групп гликанов был разработан набор изотопно-меченых реагентов **1.103–1.110** [252]. Аминоокси-производные показали лучшие результаты – как с точки зрения эффективности мечения, так и по стабильности производных в условиях МС. В настоящее время эти реагенты коммерчески доступны.

### 1.1.2.3. Модификация по гидроксильным группам

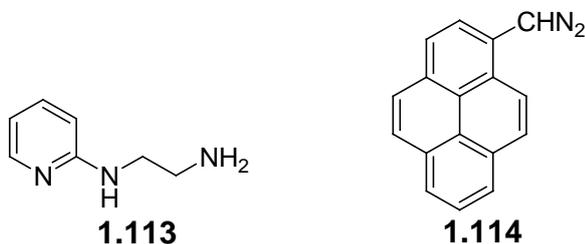
Известна способность арилборных кислот связываться с вицинальными диолами. Были получены реагент **1.111** и **1.112** и изучены возможности его применения для дериватизации углеводов и гликопептидных фрагментов [253].



Образование конъюгатов углеводов и гликопептидов с реагентами было подтверждено на основе уникального изотопного распределения в масс-спектрах продуктов дериватизации, обусловленного присутствием атома бора. Образование борных эфиров приводило к стабилизации гексозных остатков в условиях MS-MS [253].

### 1.1.2.4. Модификация по карбоксильной группе

Карбоксильная группа довольно часто встречается в природных углеводах, таких как сиаловые кислоты, являющихся *N*- и *O*-замещенными производными нейраминовой кислоты. Обычно при МС-анализе карбоксильные группы превращают в сложные эфиры или амиды. В качестве примера зарядовой дериватизации приведем работу японских ученых [254], где в роли дериватирующего агента использовался 2-(2-пиридиламино)этиламин **1.113**, который одновременно служил и флуоресцентной меткой.



Реакцию с карбоксильной группой проводили в присутствии конденсирующего реагента DMT-ММ. Помимо ожидаемых преимуществ, таких как увеличение ионизационной способности молекулы и упрощение вида масс-спектра, важным достоинством предложенного подхода оказалась стабильность конъюгата, что позволило определять структуру ганглиозидов масс-спектрометрическими методами [254].

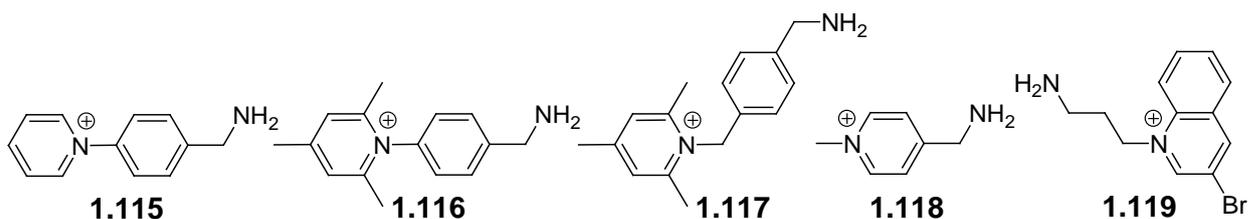
В углеводном разделе следует также упомянуть пиренилдиазометан **1.114**. Этот

реагент служит для дериватизации гликопептидов, по-видимому, по карбоксильной группе пептида (с образованием пиренилметилового эфира). При обычном МС-анализе смеси пептидов и гликопептидов пики последних практически не наблюдаются. Дериватизация пиреном повышает способность к ионизации гликопептидов и, наоборот, снижает интенсивность пиков модифицированных пептидов, оказываясь ценным инструментом в МС-анализе подобных смесей [255].

### 1.1.3 Детекция жирных кислот и липидов

Липиды можно отнести к низкомолекулярным соединениям, но из-за их роли для живых организмов (энергетической, защитной, сигнальной) и важности их детекции в клетках и тканях, их следует рассмотреть отдельно. Из липидов путем биохимических реакций получают простагландины, желчные кислоты, стероидные гормоны. Изменения в липидном профиле могут быть индикаторами различных болезней и патологий [256]. Однако химия липидов зачастую стоит особняком от химии других биомолекул из-за плохой растворимости липидов в воде. Стоит отметить, что дериватизационные подходы в химии липидов пока не столь распространены, однако в литературе есть такие примеры. Некоторые из них приведем ниже.

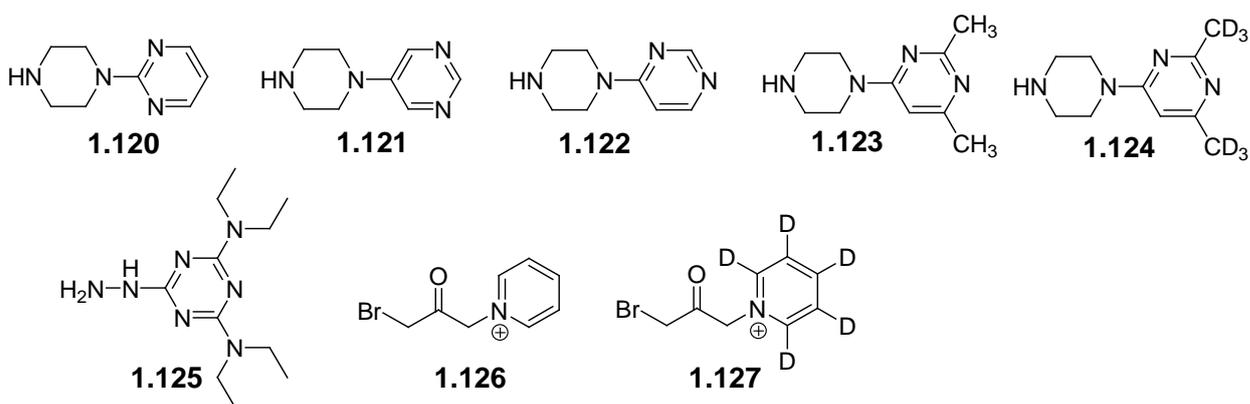
Для дериватизации жирных кислот в 2010 г. был предложен [257] и затем успешно применялся [258–263] реагент **1.115**. Реакцию проводят в присутствии конденсирующих агентов (например, EDC/НОВt) и затем детектируют кислоты в виде соответствующих амидов. Если сами кислоты детектируются в МС в виде отрицательных ионов, то продукты дериватизации – в виде положительных, со значительным возрастанием чувствительности [257].



Полиненасыщенные жирные кислоты (такие как линолевая, арахидоновая, докозагексаеновая) в обычном состоянии в организмах находятся в этерифицированных формах и в свободном виде образуются под действием фосфолипаз, выполняя далее свои функции при внешних возмущениях (воздействиях). Окисление двойных связей оказывается довольно распространенным направлением метаболизма этих соединений. Реагент **1.115** применяли для обнаружения подобных соединений; авторы также отмечают, что при смене полярности ионов чувствительность определения увеличивается в десятки раз [258]. Ещё одно применение дериватирующего агента **1.115** для

модификации карбоксильной группы продемонстрировано при исследовании липидов, влияющих на жизнеобеспечение бактерий листерий [259]. В работе [260] авторам удалось увеличить чувствительность анализа в 60 000 раз по сравнению с недериватизированным образцом при использовании в качестве «масс-метки» реагента **1.115**. Для целей дериватизации жирных кислот были описаны похожие реагенты **1.116**, **1.117** и **1.118** [263], а также бромхинолиниевое производное **1.119** [264]. Последний реагент использовался для определения как линейных жирных кислот, так и желчных кислот со стероидным скелетом. Атом брома в молекуле реагента позволяет легко идентифицировать продукты дериватизации по характерному изотопному распределению.

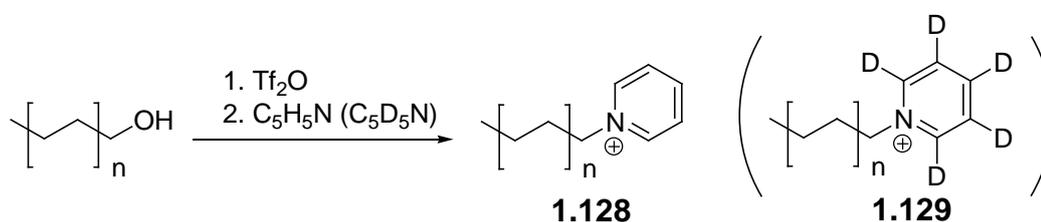
Амин **1.120**, первоначально разработанный для дериватизации фосфопептидов [265], послужил основой реагентов для дериватизации жирных кислот: теоретические расчёты показали, что среди соединений **1.120–1.122** наилучшими характеристиками с точки зрения детекции в МС должно обладать последнее соединение [266]. Была получена пара соединений **1.123** и **1.124** с разницей масс 6 Да и успешно использована для детекции карбоксил-содержащих соединений, в частности, свободных жирных кислот в моче [266], тиреоидных тканях [267] и порошковом молоке [268]. Гидразин **1.125** с успехом использовали для профилирования эйкозаноидов в плазме крови и сердечной ткани крыс (чувствительность обнаружения 0.5 пг). Конденсацию с реагентом проводили в стандартных условиях (EDC/HOBt); детектируемым продуктом являются гидразиды соответствующих кислот [269].



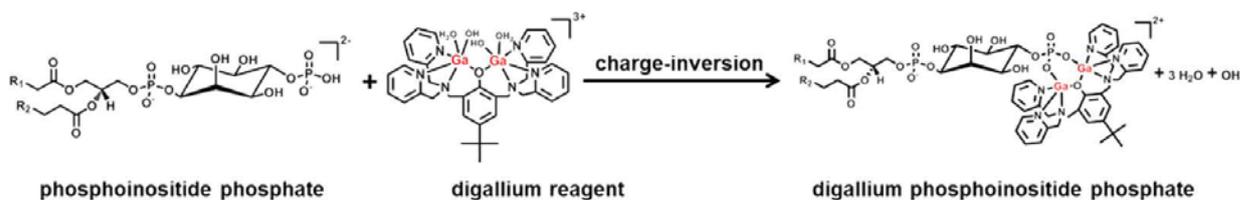
Дериватизация жирных кислот для МС может осуществляться не только с образованием амидов и гидразидов, но и сложных эфиров. Пара реагентов **1.126** и **1.127** была применена для изучения путей биосинтеза жасмоновой кислоты из  $\alpha$ -линоленовой кислоты; дериватизацию проводили в ацетонитриле в присутствии триэтиламина [270].

Спирты, содержащие 12–24 атомов углерода, образуются в живых организмах в результате восстановления соответствующих карбоновых кислот ферментом алкоголь-НАД<sup>+</sup>-оксидоредуктазой; на метаболизм этого процесса влияют такие факторы, как

алкоголь, наркотики, окружающая среда. Авторы исследования показывают, что уровень «жирных» спиртов в волосах людей, употребляющих героин, заметно снижается по сравнению с неупотребляющими. Этот подход может быть использован как при мониторинге злоупотребления наркотиками, так и для исследования различных физиологических процессов. Разработан метод превращения спиртов в алкилированный кватернизованный пиридин (дейтеропиридин). Спирты обработкой ангидридом трифторметансульфокислоты превращают в трифлаты, которые далее реагируют с пиридинами. Полученные заряженные производные **1.128** и **1.129** детектируются с высокой чувствительностью (LOD 0.25 пг/мл) [271–273]. Далее авторы развили и применили свою методику для детекции стероидов в подсолнечном масле [272] и жирных спиртов в липидах тиреоидных тканей [273].



Для дериватизации и инверсии заряда у фосфолипидов с успехом использовали биметаллические комплексы галлия [274]; интенсивность масс-спектрометрических сигналов полученных производных возрастала в десятки раз по сравнению с немодифицированными образцами. При использовании в анализе метода активируемого соударения для биметаллического конъюгата можно получить больше структурной информации, нежели для нативного липида [274].

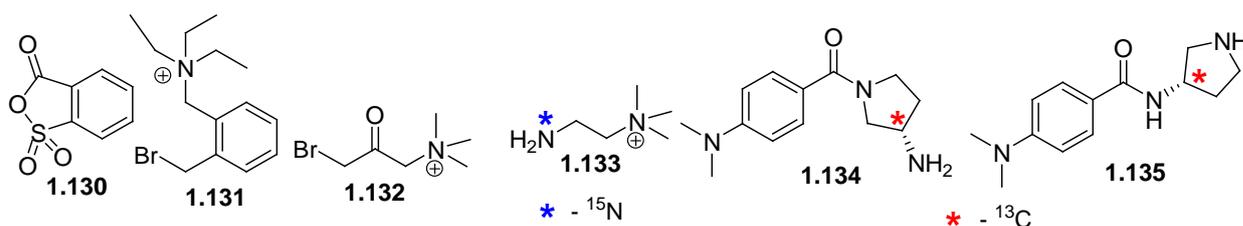


#### 1.1.4 Детекция низкомолекулярных органических соединений

Возможно, настоящий обзор можно было начать именно с этой главы, поскольку низкомолекулярные соединения являются моделями при изучении более сложных биополимеров. Кроме того, низкомолекулярные вещества в живых организмах являются объектом изучения метаболомики: по профилю метаболитов можно диагностировать патологические процессы. Низкомолекулярными веществами условно считают молекулы массой менее 1000 Да. Несмотря на относительную простоту их строения, сложность определения низкомолекулярных веществ методом MALDI-MS связана с попаданием

диапазона их масс в области «шумов» матрицы. Поэтому в случае прямого МС-анализа для улучшения детекции сигналов целевых соединений используют специальные матрицы, комбинации матриц и различные неорганические добавки к матрицам. Однако наиболее эффективным подходом оказывается химическая модификация. Дериватизация позволяет не только сместить сигнал аналита в диапазон более высоких масс, но и ввести перманентный (постоянный) заряд в молекулу, улучшая её ионизационные свойства. Кроме того, в результате дериватизации изменяются физические и химические свойства молекулы, что тоже может улучшить масс-спектрометрические характеристики вещества. Дериватизация малых органических молекул упомянута в обзорах [104, 116, 275]. Поскольку низкомолекулярные соединения и метаболиты могут содержать такие же функциональные группы, дериватизация по которым рассмотрена в разделах 1.1–1.3 (аминогруппа, карбоксильная группа, карбонильная группа, гидроксильная группа, фосфат), то приведенные в этих разделах реагенты и методы могут быть использованы для дериватизации соответствующих соединений. Приведём лишь ряд реагентов, не упомянутых в предыдущих разделах.

Для дериватизации гидроксильной группы было предложено использовать ангидрид 2-сульфобензойной кислоты **1.130** [276, 277]. Смешанный ангидрид ацилирует ОН-группу в мягких условиях, в результате образуется свободная сульфо-группа, способная легко давать анион  $[M-H]^-$ , детектируемый в режиме отрицательных ионов. Этот метод был использован для дериватизации большого набора алифатических спиртов (первичных и вторичных), ароматических спиртов, фенолов, а также гидроксильных групп в соединениях, содержащих другие функциональные группы. Предел обнаружения 4-фенилфенола составил 25 пмоль.



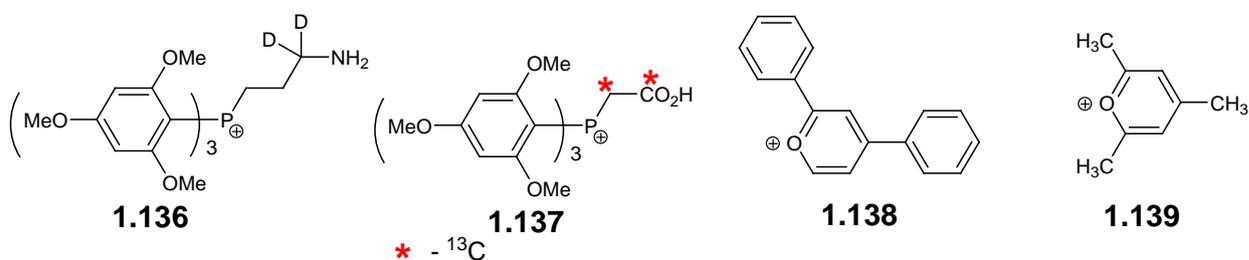
Ещё один подход к дериватизации спиртов и фенолов разработан в группе профессора Заикина. Исследуемые соединения обрабатывают бромацетилхлоридом в присутствии оснований, способных к кватернизации (триэтиламин, пиридин, дейтеропиридин, хинолин). В результате двухступенчатого превращения образуются катионсодержащие сложные эфиры, которые и детектируются в MALDI-МС [278, 279].

Реагент **1.131** даёт с фенолами и нуклеозидами заряженные продукты алкилирования; после дериватизации можно детектировать содержание тимидина до

160 амоль [280]. Реагент **1.132** служит для детекции кислот-фитогормонов (образует сложные эфиры) [281].

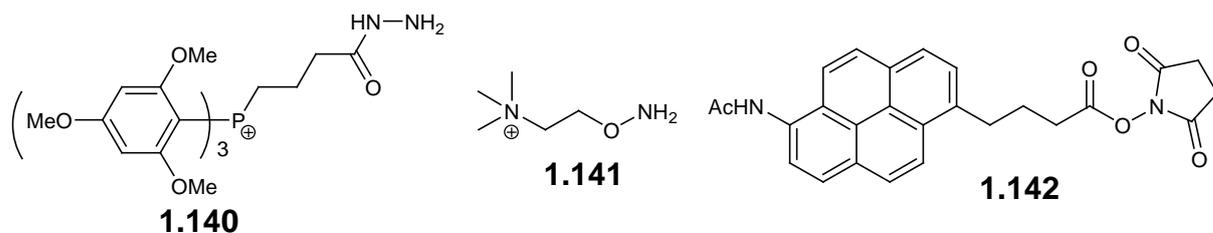
Для модификации кислот («карбоксилсодержащего метаболома») с образованием амидов применяли изотопно-меченый таг **1.133** [282]. Для таких же целей описано применение меченных по углероду аминов **1.134** и **1.135** [283]. Их хиральность служит дополнительным преимуществом; в результате при дериватизации можно различать энантиомеры кислот.

Описана дериватизация кислот с помощью упоминавшегося аминопропильного фосфониевого реагента **1.44** [284], который также получен в виде меченного дейтерием аналога **1.136** [285]. Для модификации аминов получена изотопно-меченая кислота **1.137** [285, 286]. Мечение аминов осуществляли также упоминавшимся ранее активированным эфиром **1.26** и его  $^{13}\text{C}_9$ -аналогом [287].



Наконец, следует упомянуть применение пирилиевых солей **1.138** и **1.139** в качестве реакционноспособных матриц для детекции аминов. При смешивании аминов с матрицами происходит их дериватизация с образованием производных пиридиния [288]. Авторы использовали технологию MALDI-МС-визуализации (о ней будет сказано в следующем разделе обзора) и устанавливали локализацию биогенных аминов в срезе различных тканей.

Для дериватизации карбонильных соединений использовали упоминавшиеся реагенты Гирарда **1.93** [289], а также ТМРР гидразид **1.140** [286, 292] и тетраалкиламмониевый гидроксилламин **1.141** [293]. Последний реагент помещали в микрокапилляры, что позволяло детектировать следы летучих карбонильных соединений.

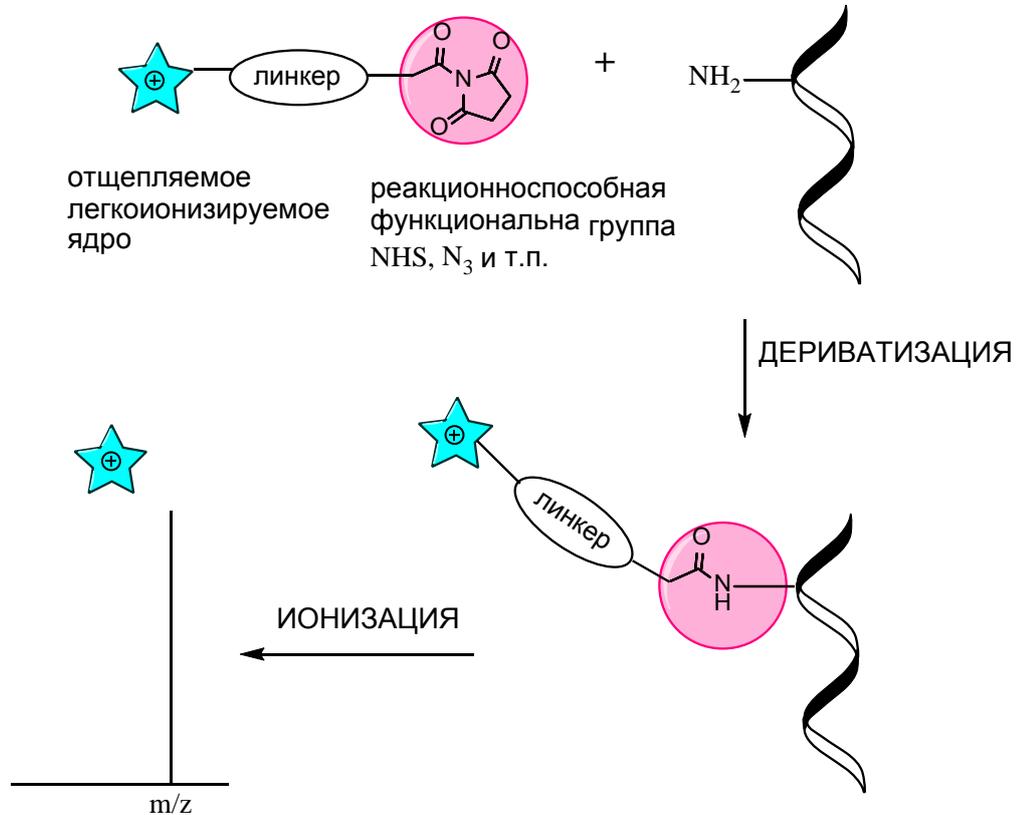


Наконец, следует упомянуть реагент **1.142**, который использовали в дериватизации и МС-анализе сложного макролидного антибиотика [294, 295]. Пиреновый фрагмент облегчает ионизацию и делает возможным LDI-МС анализ (без матрицы).

Резюмируя описанные подходы, можно с уверенностью сказать, что неотщепляемые масс-спектрометрические метки – мощный инструмент для анализа широчайшего круга биомолекул. Ещё раз обозначим их основные достоинства: увеличение молекулярной массы на строго определенную величину массы самой метки, «инкремент массы» (особенно важно для низкомолекулярных соединений), увеличение ионизационной способности аналита, повышение чувствительности и пределов детекции анализа, упрощение «картины» масс-спектра и возможность получения дополнительной структурной информации (особенно актуально при масс-спектрометрическом секвенировании биомолекул). Можно также отметить, что одни и те же масс-спектрометрические метки используются для дериватизации функциональных групп одного вида различных классов биомолекул; это подтверждает их универсальность и возможность использования при анализе сложных реальных смесей. Однако, несмотря на кажущееся разнообразие имеющихся структур, актуальным является разработка и внедрение новых масс-спектрометрических меток с целью повышения точности, экспрессности и чувствительности анализа.

## 1.2. Отщепляемые ионогенные масс-спектрометрические метки

В отличие от объектов, рассмотренных в предыдущем разделе, здесь пойдёт речь о другом типе масс-спектрометрических меток – отщепляемых (рис. 1.1б). Как правило, для таких соединений характерна следующая общая структура (рис. 1.9).



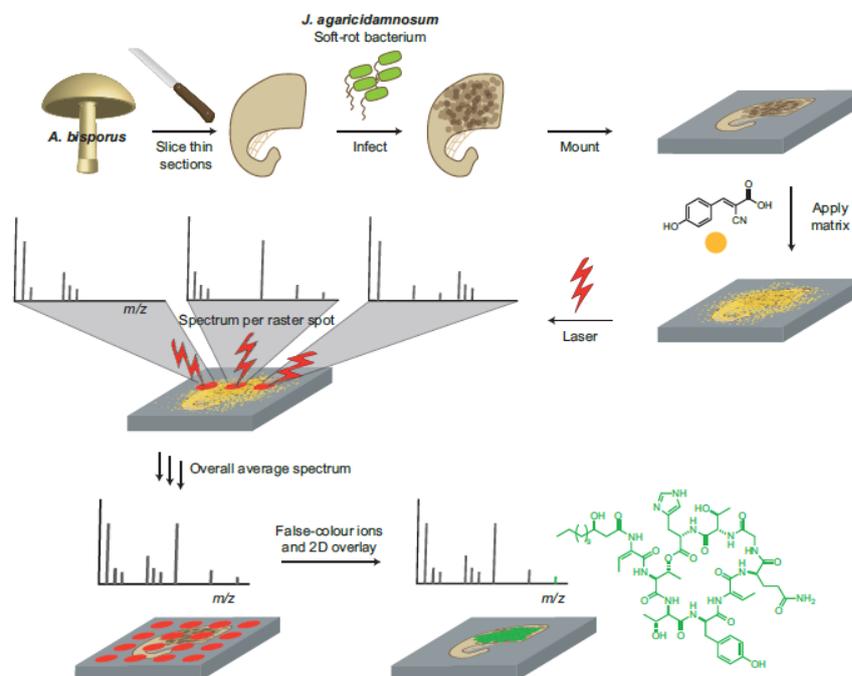
**Рис. 1.9** Общая структура отщепляемой масс-спектрометрической метки и принцип её использования для дериватизации аналита.

Как видно из рис. 1.9, главным компонентом метки служит ионизированное или легкоионизируемое ядро, связанное через линкер с реакционноспособной функциональной группой (*N*-оксисукцинимидной, азидной, малеимидной, гидразидной). Под действием лазера происходит отщепление ядра, как правило, в виде стабильной заряженной частицы, которая легко детектируется в масс-спектрометре.

Одной из перспективных областей применения масс-спектрометрических меток может быть такой современный метод как MALDI-МС-визуализация (MALDI-MS-imaging). Несмотря на его стремительное развитие широкое применение в биоорганической химии и смежных медицинских направлениях, в отечественной литературе нет сколько-нибудь существенных публикаций, посвященных этому интересному методу. Поэтому перед тем, как обсуждать использование отщепляемых меток, позволим себе дать общее представление об этом методе и его особенностях.

### 1.2.1 Общие представления о технологии MALDI-МС-визуализации

Среди всех новых методов масс-спектрометрии MALDI-МС-визуализация [296], безусловно, один из самых многообещающих в таких областях, как клиническая протеомика, доклинические исследования и медицинская диагностика. Этот высокочувствительный метод позволяет проводить прямой анализ молекул в специфичных для них участках тканей. Методика MALDI-МС-визуализации заключается в следующем: тонкий срез ткани (10–20 мкм) покрывается органической матрицей, которая кристаллизуется вместе с молекулами, присутствующими в ткани. Далее образец точно подвергают облучению лазером; поглощение кристаллами УФ-излучения лазерного импульса приводит к десорбции матрицы и молекулы аналита с поверхности образца, и регистрируется масс-спектр, содержащий сигналы десорбированных молекул. Из множества таких измерений и зарегистрированных масс-спектров получается набор данных, где каждый спектр представляет локальный молекулярный состав в известной точке образца. В итоге, для каждого из полученных сигналов может быть сгенерировано изображение. В частности, полученные величины интенсивности отдельных значений  $m/z$  в каждом спектре, соответствующие молекулярным массам определенных соединений, используются для визуализации областей внутри ткани, в которой данный тип молекул расположен (рис. 1.10).



**Рис. 1.10** Схема определения бактерий в грибах методом MALDI-МС-визуализации. Тонкий срез образца *A. bisporus* инфицировали бактерией *J. agaricidamnosum*. После заражения срез гриба анализировали методом MALDI-МС-визуализации. Анализ спектров показал, что молекулярный ион  $[M+H]^+$ , соответствующий липопептиду, образующемуся при инфицировании (выделен зеленым цветом,  $m/z = 1.181$ ), присутствует только в заражённых областях [297].

Так как такие молекулярные карты могут быть получены по одному или нескольким анализам одновременно без применения химических зондов, МС-визуализация является подходящим дополнением к существующим и используемым методам анализа тканей, таких как иммуногистохимия, магнитно-резонансная томография, позитронно-эмиссионная томография, флуоресцентная визуализация в ближнем ИК-диапазоне и радиоавтография. Иммуногистохимический анализ служит очень мощным методом, но для его проведения необходимо предварительное знание молекулы-мишени, а также наличие соответствующего антитела. Кроме того, возникают определенные сложности при интерпретации полученных результатов. В случае МС визуализации отображается наличие/отсутствие белков, являющихся уникальными для патологического состояния (биомаркеров) или данные об их регуляции. На данный момент сочетание гистологических анализов и МС визуализации имеет большой потенциал для использования в области диагностики заболеваний, прогнозирования и, в отдельных случаях, даже терапевтического лечения [298].

Таким образом, метод MALDI-МС-визуализации к настоящему времени оказался наиболее универсальным методом ионной визуализации; он имеет целый ряд преимуществ, таких как широкий диапазон сканируемых масс (теоретически 200–1000000 Да), возможность анализа сложных смесей, простая интерпретация данных (пики, соответствующие отношению  $m/z$ ) и высокая чувствительность (до аттомолей для белков и пептидов). Все эти особенности привели к тому, что МС визуализация с использованием MALDI наиболее распространен по сравнению с применением других методов ионизации.

Тем не менее, метод MALDI-МС-визуализации не лишен недостатков. Липиды, пептиды и белки, метаболиты, лекарственные препараты, как уже отмечалось, могут быть легко детектированы. Однако транскриптом, который включает в себя микроРНК и другие молекулы РНК, до сих пор не удавалось визуализировать таким образом. Поскольку анализ транскриптома в настоящее время является важной областью клинических исследований, это, безусловно, составляет важное направление для развития MALDI-МС-визуализации. Одним из возможных решений этой проблемы может быть использование масс-спектрометрических меток.

#### **1.2.1.1 Ионизация в методе MALDI-МС-визуализации**

При использовании в качестве метода ионизации MALDI важное значение отводится роли матрицы. При облучении ячейки мишени УФ-лазером происходит кооперативное движение кристаллов матрицы в вакуум, в котором захватывается также анализируемое вещество. Молекулярная динамика этого процесса зависит от порогового значения плотности энергии. Ниже порогового значения молекулы с низкой энергией связи

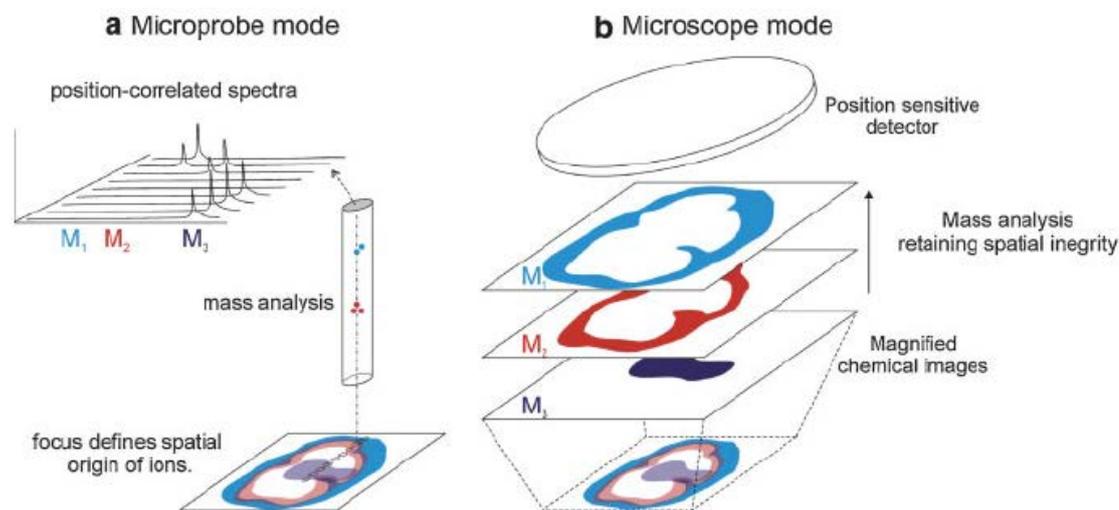
сублимируются с поверхности. Выше порогового значения происходит выталкивание кластеров матрицы с аналитом в газовую фазу.

MALDI работает в так называемом термоизоляционном режиме, при котором процесс поглощения энергии и последующая десорбция должны количественно превосходить процесс перераспределения энергии по всему образцу. При уменьшении диаметра лазерного пучка скорость перераспределения энергии быстро увеличивается, и для десорбции необходимо излучение с более высокой плотностью энергии. Однако в этом случае происходит фрагментация исследуемых молекул. Показано, что использование лазерного пучка диаметром 7–8 мкм приводит к уменьшению ионных выходов на два порядка по сравнению с использованием стандартного, более 100 мкм, лазерного пучка [299]. Наряду с десорбцией происходит ионизация молекул аналита, протекание которой определяет вид полученного масс-спектра. Основным механизмом ионизации для немодифицированных аналитов является реакция переноса протона или катионов, конечные продукты определяются относительным сродством частиц, присутствующих в газовой фазе, к протонам или катионам. Большое количество катионизированных пептидов и белков в MALDI-МС-визуализации срезов ткани значительно усложняет масс-спектры, а также приводит к более низким значениям интенсивности сигналов (сигнал иона делится между несколькими пиками). Для устранения этой проблемы срезы ткани часто обессоливают путем промывки в холодном растворе этанола [300].

Многочисленность факторов, влияющих на выбор оптимальной матрицы для конкретного аналита, приводит к тому, что задача выбора матрицы становится эмпирической и, как правило, решается экспериментально в каждом случае, хотя и существуют некие общие закономерности, например, для анализа ткани синапиновая кислота как матрица обеспечивает лучшие сигналы для белков с более высокой молекулярной массой, в то время как 1-циано-4-гидроксикоричная кислота является более подходящей матрицей для пептидов с низкой молекулярной массой. Синапиновая кислота рекомендована для получения в процессе анализа более высокого пространственного разрешения, в котором осаждение раствора матрицы тщательно контролируется с целью сведения к минимуму пространственного перемещения [301]. Для анализа МС/МС обычно используют матрицы, способствующие образованию ионов пептидов или белков с запасом внутренней энергии, так как это приводит к дальнейшей фрагментации на структурно информативные частицы [302, 303].

### 1.2.1.2 Техника получения изображения: режимы микрозонда и микроскопа

МС визуализация осуществляется с использованием двух различных подходов: применение микрозонда или микроскопа. Разница между этими режимами заключается в способах получения пространственной информации (рис. 1.11).



**Рис. 1.11** Схемы, иллюстрирующие два подхода в МС-визуализации: (а) в режиме микрозонда записываются масс-спектры в каждой заданной позиции. Используется ионно-оптический микроскоп; (б) в режиме микроскопа изображение распределений масс в образце регистрируется с помощью 2D-детектора.

Микрозонд является наиболее распространенной техникой в МС визуализации и принципиально самой простой. Для анализа используют небольшой лазерный луч, локализованной на образце. Полученный масс-спектр наряду с координатой точки в пространстве сохраняется, после чего анализируется новая область и регистрируется другой масс-спектр. Этот процесс повторяется до тех пор, пока вся область образца не будет просканирована. После завершения эксперимента визуализация происходит из индивидуальных масс-спектров. Режим визуализации с помощью микроскопа требует использования ионно-оптических элементов, проецирующих пространственное распределение ионов, генерируемых на поверхности образца, на позиционно-чувствительный детектор. С помощью этого подхода пространственная информация может быть получена внутри ионизационного пятна и, таким образом, не зависит от размера ионизирующего пучка, а определяется характеристиками микроскопа, качеством ионной оптики. Разрешающую способность определяет позиционно-чувствительный детектор. Как и со всеми микроскопами, фокус масс-спектрометрического микроскопа имеет конечную глубину, что делает подготовку образца более важной [304].

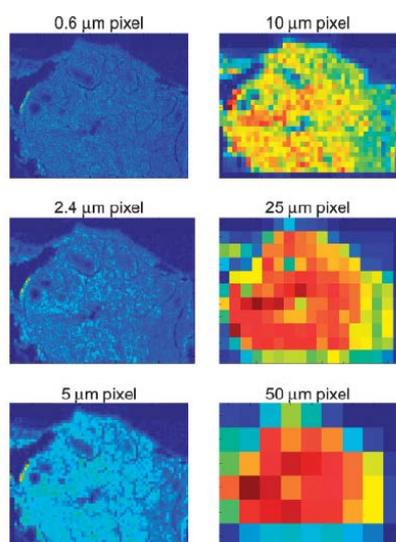
### 1.2.1.3 Разрешение

МС-визуализация характеризуется тремя типами разрешения: разрешение по массе, пространственное разрешение и разрешение по глубине.

**Массовое разрешение** определяет степень химической специфичности и характеризуется возможностью различать ионы с разными отношениями заряда к массе. Возможность различать два иона с похожими отношениями  $m/z$  прямо связана с возможностью разделить в масс-спектре два пика, соответствующие этим ионам. Повышение точности измерения массы позволяет различать продукты ионизации даже при малых значениях масс, и, таким образом, приводит к более точной обработке данных. Показано, что процент определения уникальных триптических пептидов увеличивается с повышением точности измерения массы и увеличения отношения  $m/z$  [305]. Точные измерения в области низких молекулярных масс могут быть использованы для определения элементного состава обнаруженных ионов.

В настоящее время в большинстве приборов для проведения МС-визуализации используют времяпролетные (ToF) анализаторы, которые могут обеспечить разрешение до 20 ppm. Сверхвысокого разрешения по массе удается достичь, используя ионно-циклотронную ловушку в качестве масс-анализатора [306, 307].

**Пространственное разрешение** определяет степень детализации изображения и характеризуется наименьшим измеряемым расстоянием между близлежащими объектами. Этот тип разрешения можно описать в терминах пикселей в фотографии: чем лучше различаются отдельные пиксели, тем выше будет разрешение. На пространственное разрешение влияют многие факторы, такие как пространственное распределение аналита в образце, подготовка пробы, возможности прибора и интенсивность сигнала.



**Рис. 1.12** Изображения участков ткани теменной ганглии улитки *Lymnaea stagnalis*, полученные методом SIMS МС-визуализации с различными размерами пикселя [299].

При подготовке образца для исследования и получения высокого разрешения важно по возможности сохранять пространственную целостность образца. Любое искажение пространственной целостности по размеру большее, чем размер пикселя, ограничивает получаемое в эксперименте пространственное разрешение (рис. 1.12).

*Разрешение по глубине.* Химическую информацию о составе образца не на поверхности, а в глубине среза ткани можно получить, если проводить несколько последовательных измерений в одной точке пространства. Такой анализ профиля пробы по глубине, как правило, ограничивается тем, что для прохождения ионов из глубины на поверхность образца требуется высокая энергия, что приводит к образованию очень маленьких фрагментов молекул и прочим химическим повреждениям. Первичные ионы, образующиеся в глубине образца, при выходе на поверхность соударяются с верхними слоями, тем самым смешиваясь с ними и нарушая их состав, что ухудшает разрешение. В первых экспериментах 3D MALDI-МС-визуализации [308] были использованы десять последовательных срезов ткани мозга мыши толщиной 20 мкм. В результате глубина визуализации составила 400–500 мкм. Повысить разрешение возможно, если проводить анализ большего количества срезов, однако, это может быть непрактично в связи с увеличением времени анализа.

Особенно стоит отметить, что для проведения МС-визуализации рельеф образца и его 3D-форма имеют особенное значение, так как такие неточности в проведении эксперимента могут привести к появлению артефактов метода [309].

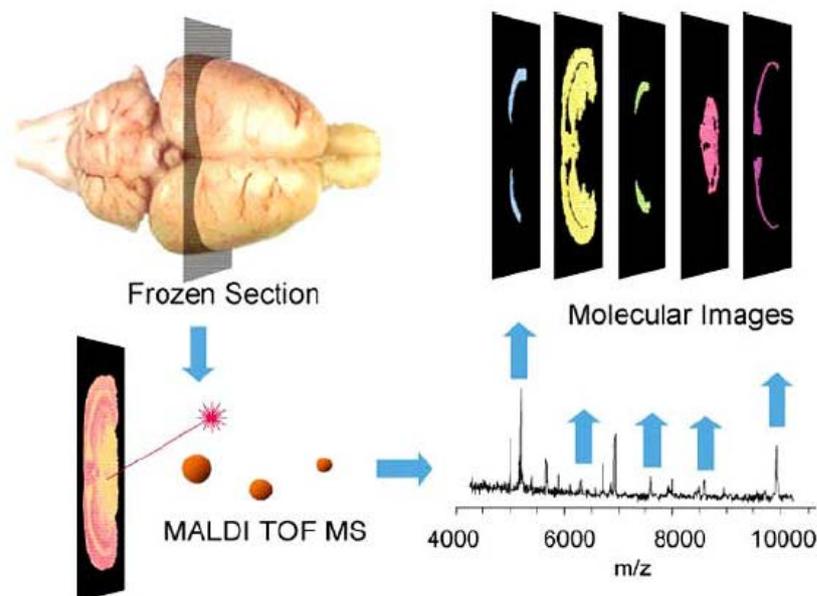
#### **1.2.1.4 Подготовка образцов для MALDI-МС-визуализации**

Воспроизводимость МС визуализации определяется многими факторами на каждом этапе эксперимента, начиная от выбора образца, его подготовки, непосредственно МС и заканчивая интерпретацией данных. Очевидно, что в процессе подготовки должна сохраняться пространственная и химическая целостность образца, определяемые пространственным разрешением метода используемой МС.

Существует несколько общих правил при подготовке образцов. Разные методы ионизации могут быть чувствительны к различным типам примесей. МС визуализация срезов тканей с использованием MALDI требует промывки ткани перед нанесением матрицы [300]. Стандартная процедура включает промывку ткани в ледяном 70% растворе этанола в течение нескольких минут. При этом удаляется избыток солей, нарушающих процессы кристаллизации и комплексообразования аналитов и молекул матрицы, а также конкурирующих с аналитами за заряд.

Установлено, что протеом животного мозга меняется практически сразу же после смерти. Для денатурации активных протеаз и последующих расщеплений протеома мозг животных обрабатывают микроволновым излучением [307, 310]. Затем, как правило, из внутренних частей образцов ткани изготавливают криосрезы. Приготовление криосрезов можно проводить в желатине [311] и агарозе [301], что облегчает обработку небольших или хрупких образцов, однако чаще всего срезы делают непосредственно с образцов замороженной ткани [300]. Толщина используемых срезов тканей, как правило, 10–20 мкм: ультра-тонкие образцы могут быть очень хрупкими для различных манипуляций, в то время как для более толстых необходимо больше времени, чтобы высушить их, а также большая толщина может влиять на производительность масс-анализатора.

В работе [312] установлен предпочтительный метод последующего размораживания криосреза: срез ткани помещали на холодную пластину (прозрачное проводящее предметное стекло, на котором производится МС), а затем быстро нагревали пластину вместе с образцом. Альтернативный способ размораживания на пластине при комнатной температуре привел к ухудшению качества масс-спектра. Следующий шаг в подготовке среза ткани для MALDI-МС-визуализации – промывка, выбор матричного раствора, размера кристаллов матрицы, а также метода нанесения матрицы. Стоит отметить, что температура и влажность окружающей среды при нанесении матрицы влияют на результат анализа, предположительно, из-за различной скорости диффузии белка из ткани и различной скорости кристаллизации матрицы. Для исследований с более низким пространственным разрешением, менее 25 мкм, лучшие результаты были получены с использованием синапиновой кислоты при ее нанесении непосредственно на срез ткани. Также установлено, что выбор оптимального растворителя для нанесения матрицы зависит от типа ткани. Использование ионных матриц для срезов тканей значительно улучшает интенсивности сигнала [313]. Итак, принципиальная схема MALDI-МС-визуализации выглядит следующим образом (рис. 1.13): криосрез ткани, покрытый матрицей, анализируется методом MALDI масс-спектрометрии, массив спектров для каждой определенной точки пространства получают методом лазерной ионизации и детекции ионов. В дальнейшем используют специальное программное обеспечение для получения распределений и обработки изображений.



**Рис. 1.13** Принципиальная схема MALDI-МС-визуализации.

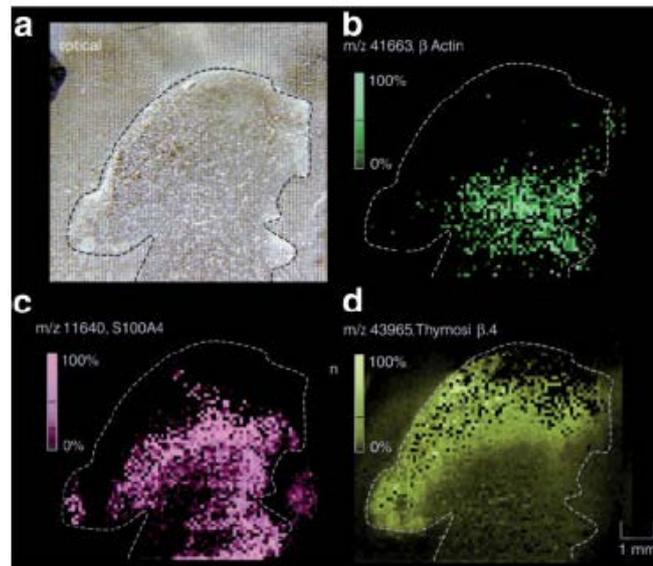
Разработка новых подходов и методик МС визуализации позволяют снижать влияние различных артефактов, а также повышать чувствительность, скорость и пространственное разрешение в анализе. Существует несколько аспектов применения новых подходов в эксперименте, связанных с процессом образования ионов аналита, использованием новых масс-анализаторов и детекторов.

#### 1.2.1.5 Обработка и визуализация данных

В результате МС визуализации исследователь получает очень большой массив данных: полный масс-спектр для каждой точки-пикселя. Для обработки данных и их визуализации разработан широкий набор различных инструментов, включающих в себя такие стандартные функции, как анализ определенного интересующего участка, выбор шкалы интенсивности изображения (цветовая палитра, линейная/логарифмическая), наложение изображений друг на друга, сохранение спектральных данных и изображений для улучшения отношения сигнал/шум, регистрация профилей интенсивности (изменение интенсивности со временем или пространством), химические библиотеки для идентификации аналита [314].

#### 1.2.1.6 Применение MALDI-МС-визуализации

Как отмечалось ранее, многие заболевания и системы иммунных ответов связаны с изменениями пространственного распределения и/или модифицирования биомолекул. На рис. 1.14 показано, как быстро с помощью МС визуализации можно определить белки, связанные с опухолью [299].



**Рис. 1.14** Распределение белков из секции глиобластомы: а) оптическое изображение среза ткани; б)  $\beta$ -актин; с) S100A4; д) тимозин  $\beta$ 4.

Более того, недавно было показано, как протеомное распределение, полученное непосредственно из свежемороженой опухоли легочной ткани, может быть использовано для классификации гистологических групп и выявления пациентов с плохим и хорошим прогнозом [315]. Другой пример применения МС визуализации - анализ холестерина и липидов, позволяющий изучать роль этих соединений при различных клинических нарушениях, таких как болезнь Альцгеймера [316, 317]. Показано, что повышение уровня холестерина приводит к накоплению белка-предшественника  $\beta$ -амилоида, а аномальное накопление пептидов, полученных из этого белка, характерно для всех форм болезни Альцгеймера.

Болезнь Паркинсона, повреждения мышц [318], дефицит витамина D [319], различные виды опухолей, демиелинизация, вызванная инсультом [320], – все указанные болезни исследованы с использованием МС визуализации. Разработка новых лекарств в настоящее время также сопровождается мониторингом с применением этой технологии.

MALDI-МС-визуализация широко используется для анализа пространственного распределения лекарственных средств и их метаболитов в тканях [302, 303, 321–323]. Развитие тандемной MALDI-МС-визуализации направлено на то, чтобы отличить фармацевтические препараты от аддуктов с матрицей.

МС визуализация также широко используется в фундаментальной биологии. Большинство экспериментов MALDI-МС-визуализации проводят при изучении срезов тканей, взятых из мозга животных, придатка яичка [324], эпидермиса [323], суставного хряща [303], предстательной железы [325], ганглий [301] и даже целых участков тела. Эти исследования направлены на анализ экспрессии белков, их пространственного

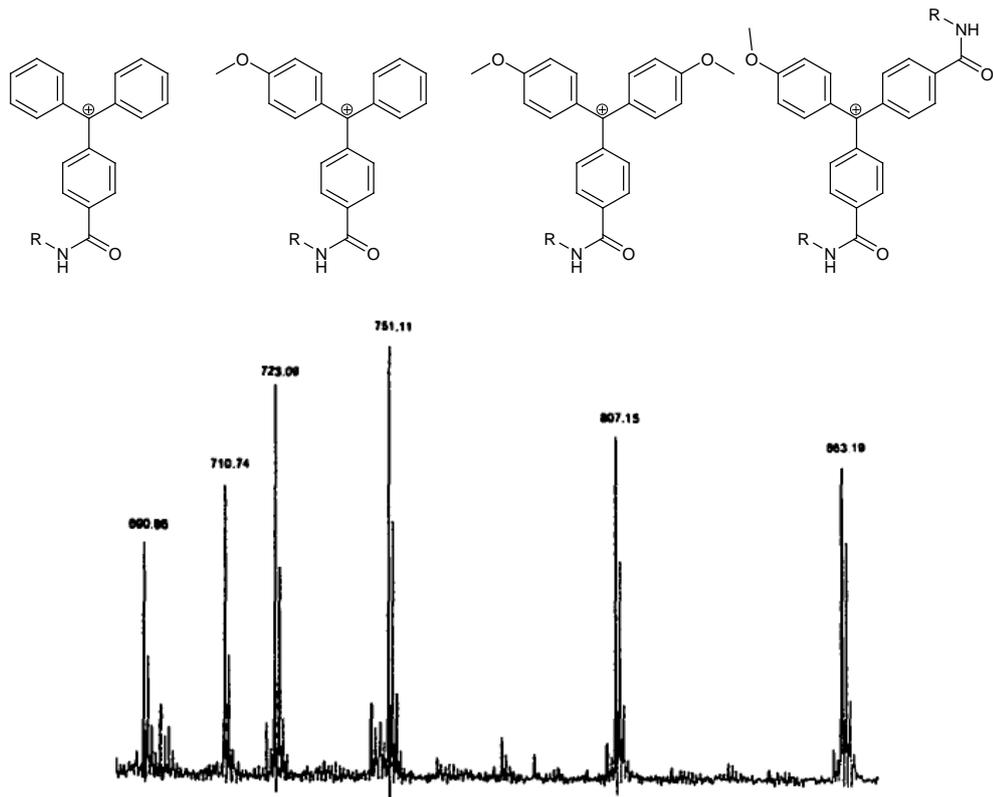
распределения, процессинга в конкретных участках и тканях, а также их влияния на возникновение многочисленных патологий.

Для преодоления проблем, связанных с артефактами метода MALDI-МС-визуализации, такими как топография поверхности образца (неоднородное пространственное распределение аналитов) [326] и матричные эффекты [309, 327–330], используют различные подходы, начиная от тандемной масс-спектрометрии, использования позиционно-чувствительных детекторов [304], 3D-MALDI-МС-визуализации [331] до химической модификации. На последнем подходе остановимся подробнее, так как он напрямую имеет отношение к теме настоящего обзора. В предыдущей главе обзора мы вскользь упомянули об использовании пирилиевых солей и производных коричневого альдегида в качестве неотщепляемых масс-спектрометрических меток для анализа биогенных аминов [288]. Далее в настоящей главе речь пойдет об отщепляемых масс-спектрометрических метках, и мы покажем, как они используются в технологии MALDI-МС-визуализации.

## 2.2 Отщепляемые масс-спектрометрические метки

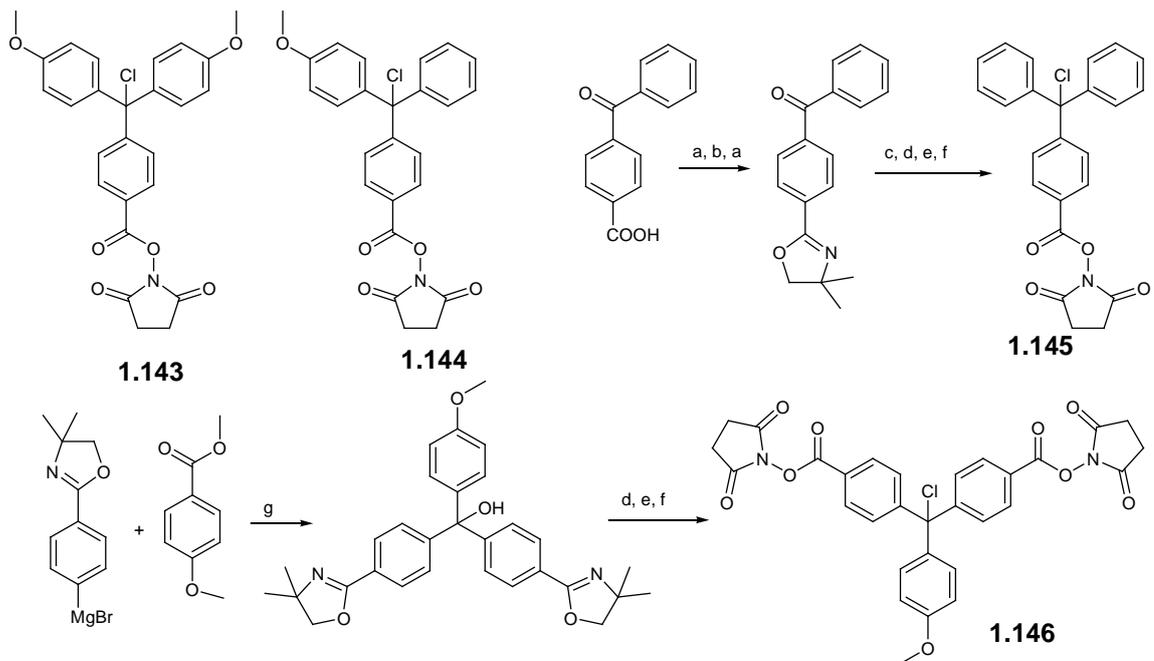
Простейшим сопряженным ароматическим карбокатионом является трифенилметилиевый катион. Его производные коммерчески доступны и могут быть легко синтезированы в лаборатории, поэтому логично, что именно этот катион впервые начали использовать для дизайна масс-спектрометрических меток.

В работе [332] показана возможность применения масс-спектрометрических меток для определения неизвестной последовательности синтетического олигонуклеотида. Для этого в процессе твердофазного синтеза использовали фосфорамидиты аденина, гуанина, цитозина и тимина с добавлением амидита метки. Для разных нуклеотидов использовали тритильные метки с различными заместителями (рис. 1.15), и, тем самым, на каждой стадии синтеза масс-спектрометрическая метка определенной массы соответствовала определенному нуклеотиду. Эти олигонуклеотиды впоследствии отбирали с помощью меченых зондов и, после кислотной обработки, анализировали методом (МА)LDI-МС, а затем по полученным масс-спектрам (рис. 1.15) определяли последовательность олигонуклеотидов: зная, на какой стадии и какая масс-спектрометрическая метка кодировал тот или иной нуклеотида, можно определить всю последовательность олигонуклеотидов.



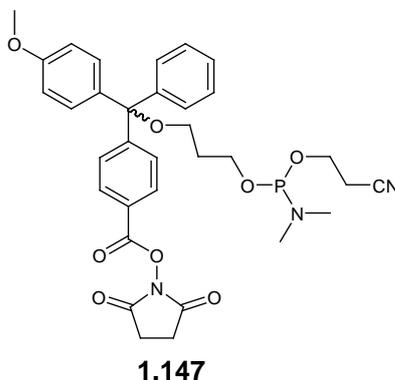
**Рис. 1.15** Масс-спектр смеси меток, полученных действием на NHS-активированный эфир различных аминов.

В следующих своих работах авторы развили данный метод, описали синтез масс-спектрометрических меток (схема 1.2) [333], их применение показано на примере 80 аминов, продукты дериватизации которых были проанализированы методом LDI-МС.



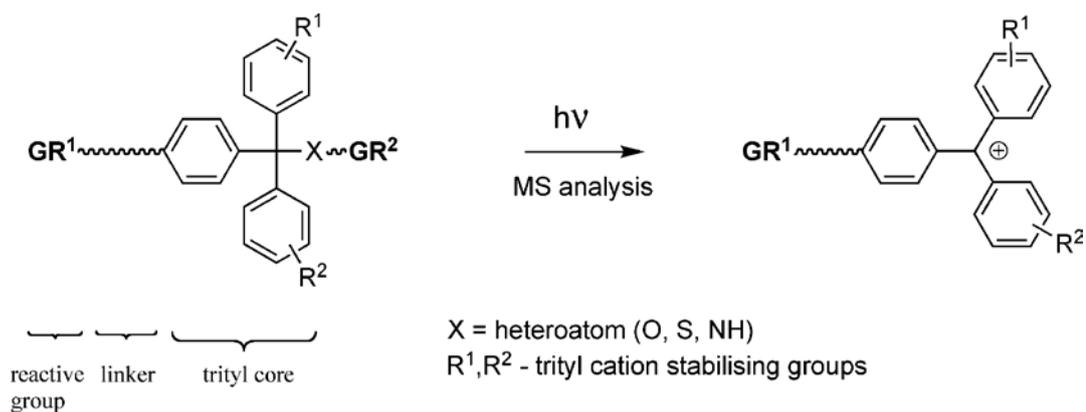
**Схема 1.2** Синтеза тритильных масс-спектрометрических меток: (a)  $\text{SOCl}_2$ , кипячение; (b) 2-амино-2-метилпропан-1-ол, 2.5 экв.; (c)  $\text{PhMgBr}$ . (d) 80%  $\text{AcOH}$ , 48 ч; (e) *N*-гидроксисукцинимид, ДЦК; (f)  $\text{AcCl}$ , толуол, кипячение; (g) реакция с реактивом Гриньяра.

Из набора соединений комбинаторных библиотек было выбрано соединение **1.144**, превращенное в амидитный синтон **1.147**, который затем добавляли (в количестве 5%) к четырем растворам нуклеозидных амидитов (A,C,G и T).



Процедура кодирования и определения последовательности была аналогична той, что описана в предыдущей работе. Также в этой работе показано, что для ионизации тритильного катиона нет необходимости в использовании матрицы, и, кроме того, не нужно подкислять определяемые конъюгаты, что удобно для пробоподготовки и при работе с кислотонестойкими веществами. Используя модификации тритильной группой, также методом MALDI-MS можно исследовать плохо ионизирующиеся вещества.

Еще одно исследование, посвященное тритильным масс-спектрометрическим меткам, было опубликовано в 2008 году [202]. В работе подробно описан синтез масс-спектрометрических меток и даны основные подходы к их дизайну и формированию структуры (схема 1.3).



a)  $\text{GR}^1 = \text{mass-modifying group}$ ,  $\text{GR}^2 = \text{biomolecule}$

b)  $\text{GR}^1 = \text{biomolecule}$ ,  $\text{GR}^2 = \text{hydroxyl, solid phase, solubility function, etc}$

**Схема 1.3** Общая структура и принцип действия масс-спектрометрических меток а) отщепляемые масс-спектрометрические метки, б) ковалентно связанные (неотщепляемые) масс-спектрометрические метки.

Синтезирован ряд производных тритильного катиона с электронодонорными заместителями, стабилизирующими положительный заряд, и проведена оценка их стабильности, установлены значения  $pK_{R+}$  (подробнее об этой величине будет сказано в обсуждении результатов). Авторами была выявлена корреляция между значением  $pK_{R+}$  и стабильностью карбокатиона – чем выше значение  $pK_{R+}$ , тем более стабильным является катион (рис. 1.16). Как мы уже неоднократно отмечали, стабильность карбокатиона – важнейшее свойство масс-спектрометрической метки [202].

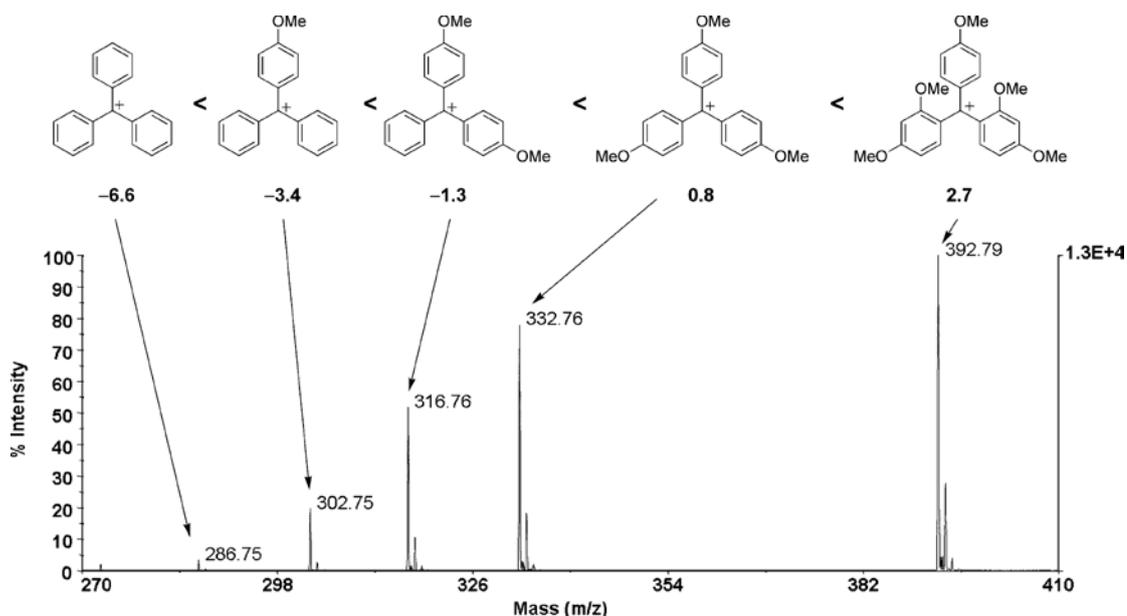
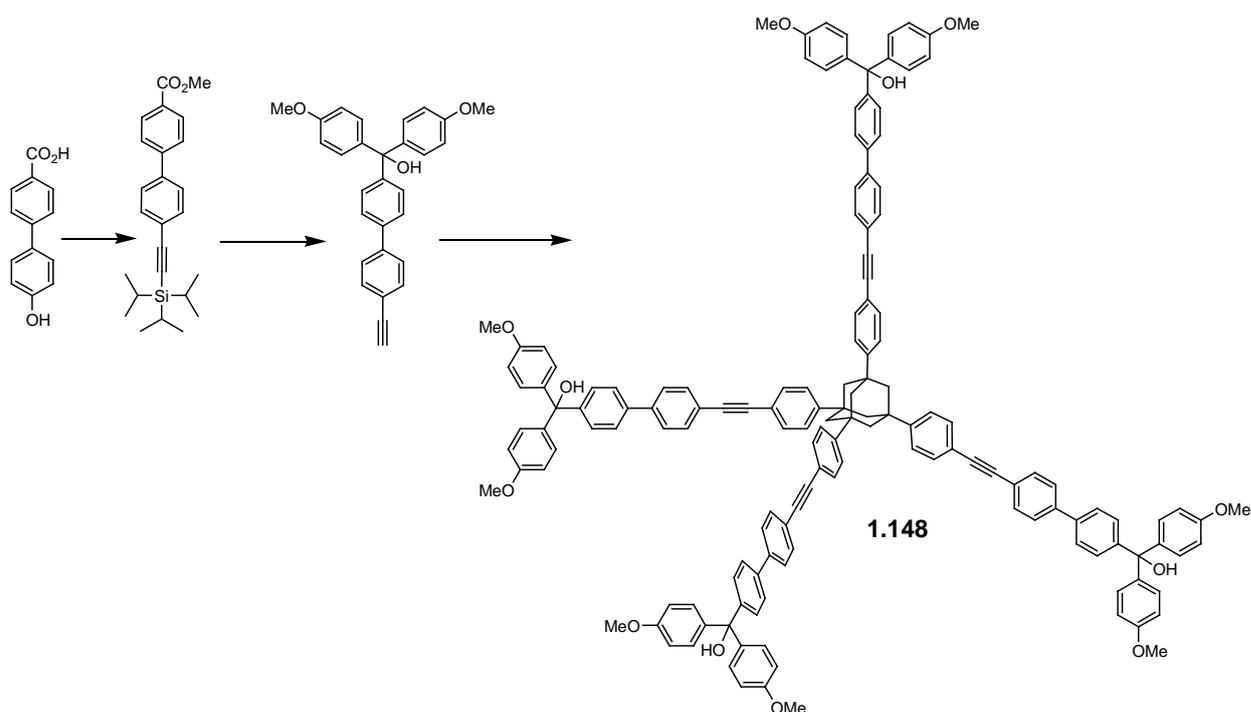


Рис. 1.16 Соотношение интенсивности сигнала катионов в масс-спектре и их значения  $pK_{R+}$ .



Синтезировав и исследовав соединение **1.148**, авторы обнаружили, что политритилированные соединения в условиях MALDI приобретают заряд +1, несмотря на

возможность отщепления нескольких гидроксильных групп у третичных атомов углерода (рис. 1.17).

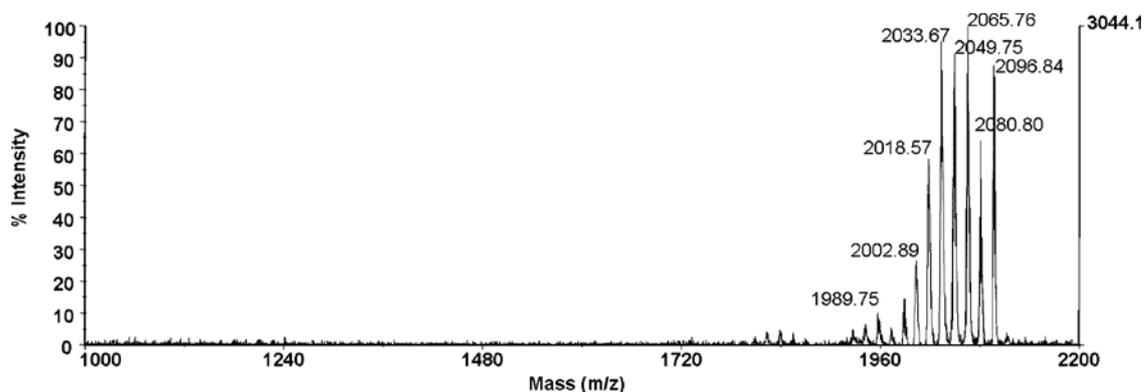
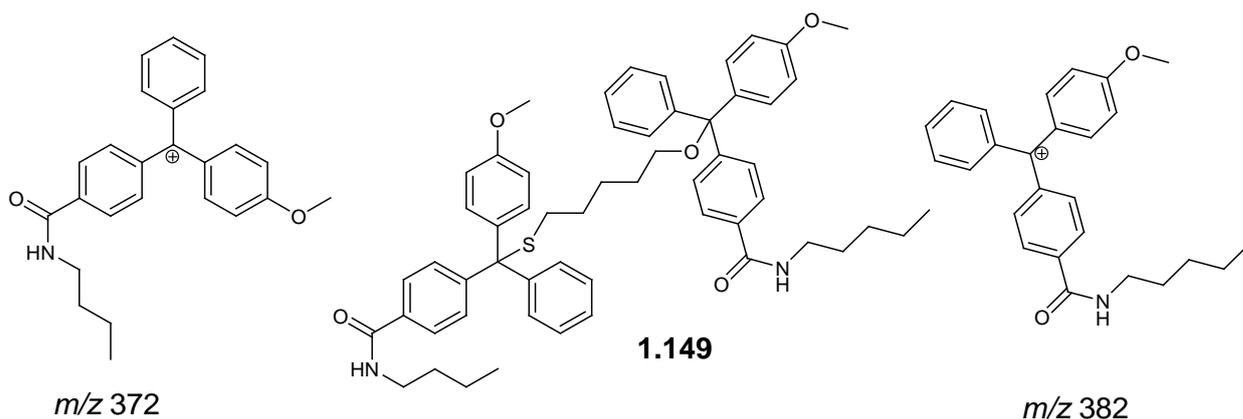


Рис. 1.17 MALDI масс-спектр тетратритильного соединения **1.148**.

В работах [334, 335] был описан подход к детекции однонуклеотидного полиморфизма с помощью полимеразной достройки меченых тритильными соединениями праймеров. Также был проведен интересный эксперимент: синтезировано соединение **1.149**, тритилированный по обоим концам 6-меркаптогексанол (рис. 1.18), причем тритильные катионы отличались по массе на гомологическую разницу. Несмотря на строгое соотношение двух тритильных фрагментов в молекуле 1:1 на масс-спектре чётко видно, что интенсивность сигнала тритильного катиона, связанного через атом серы, намного выше, чем связываемого через атом кислорода. Замена атома кислорода на атом серы даёт не только улучшение масс-спектрометрических свойств метки, но также увеличивает её химическую стабильность, что может найти применение при создании устойчивых, коммерчески доступных реагентов.



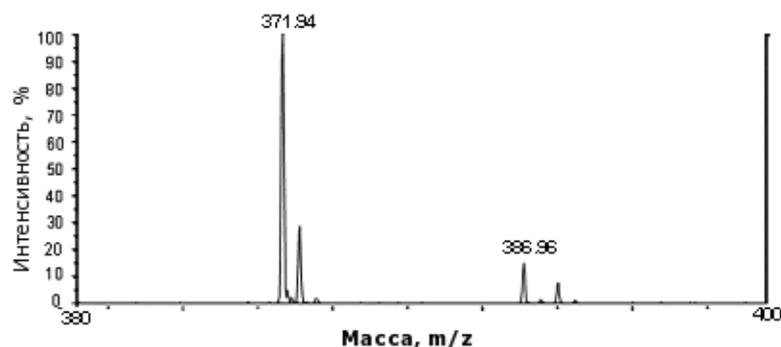


Рис. 1.18 спектр LDI-МС соединения **1.149**.

Другой разновидностью тритильных катионов является *S*-пиксильный катион **1.150** [336], однако его производные **1.151** химически малостабильны. При окислении атома серы до сульфоксида химические свойства полученного соединения **1.152** значительно изменяются по сравнению с неокисленным соединением **1.151**. Установлено, что окисленная форма (сульфоксид) не обладает достаточным значением  $pK_{R^+}$  для ионизации в кислых условиях (таблица 1.2). Свойства *S*-пиксил производных значительно меняются при окислении атома серы до соответствующего сульфоксида:

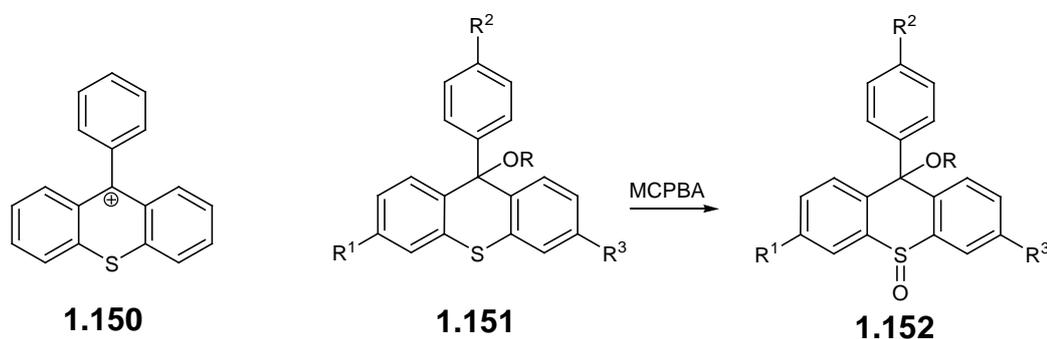


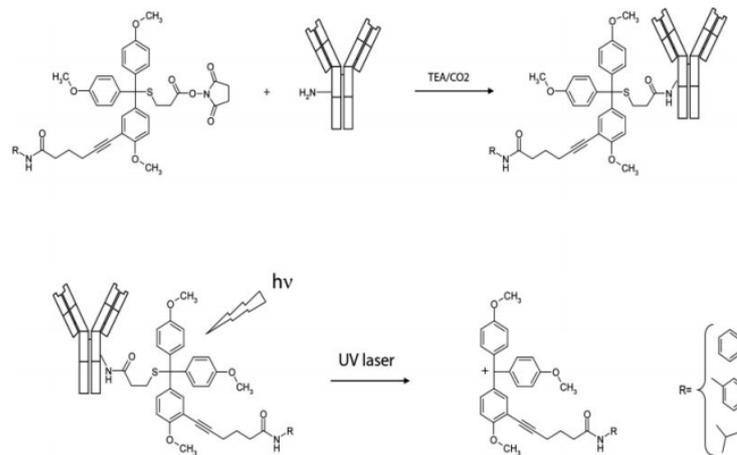
Таблица 1.2 Значения  $pK_{R^+}$  производных *S*-пиксильного катиона

Заместители			$pK_{R^+}$	
$R^1$	$R^2$	$R^3$	S-Px	S(O)-Px
H	H	Me	-0.2	-15
H	H	OMe	0.2	≈-11
OMe	H	Me	2.8	≈-12
OMe	OMe	Me	4.5	-7.1

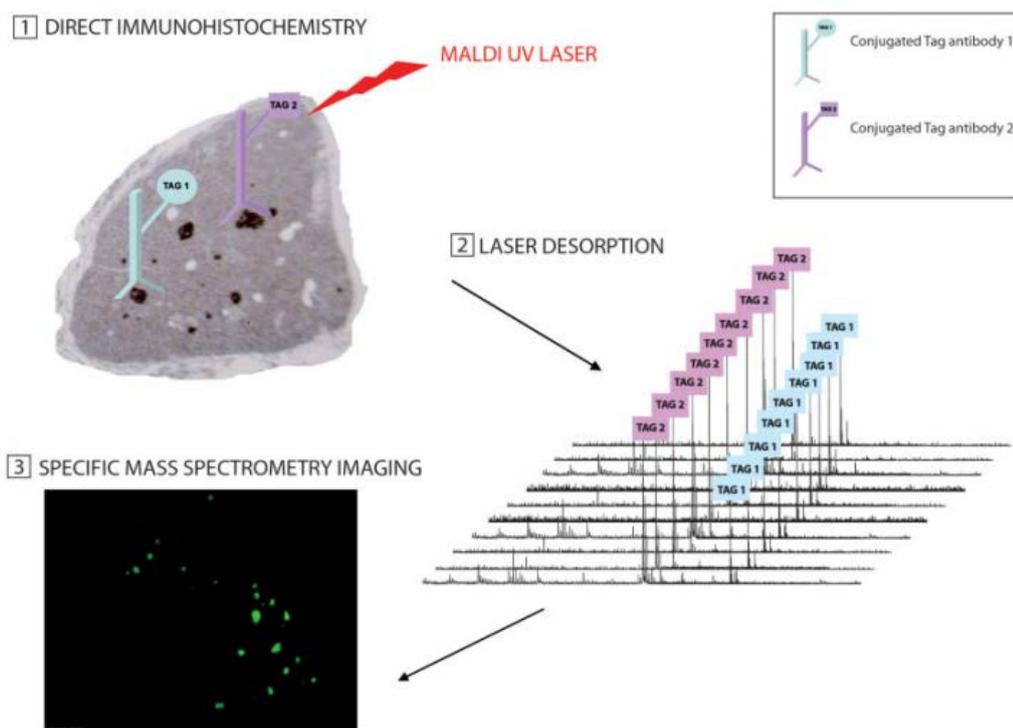
Для дальнейшего масс-спектрометрического анализа производных **1.152** необходимо было восстановить мостиковый атом серы, так как сульфоксиды имеют низкие значения

$pK_{R+}$  и их эффективная детекция невозможна. Однако в ходе эксперимента установили, что образование катиона и восстановление атома серы происходит непосредственно при облучении лазером в масс-спектрометре. Более того, эти данные были получены в условиях LDI-МС, т.е. такие масс-спектрометрические метки десорбируются с поверхности даже без использования матрицы.

Использование масс-спектрометрических меток в методе MALDI-МС-визуализации подразумевает дополнительные стадии пробоподготовки, однако одновременно с этим позволяет расширить границы возможностей применения метода. Сообщается об использовании производных триметокситритильного катиона, обладающих сайтом вариации масс [337] (схема 1.4). Первичные антитела дериватизируются масс-спектрометрическими метками, затем эти антитела связываются с соответствующими антигенами в исследуемой ткани, после чего вся площадь ткани анализируется методом MALDI-МС-визуализации. После визуализации, сопоставляя массу метки и кодируемый ею белок, можно определить локализацию белка в ткани.



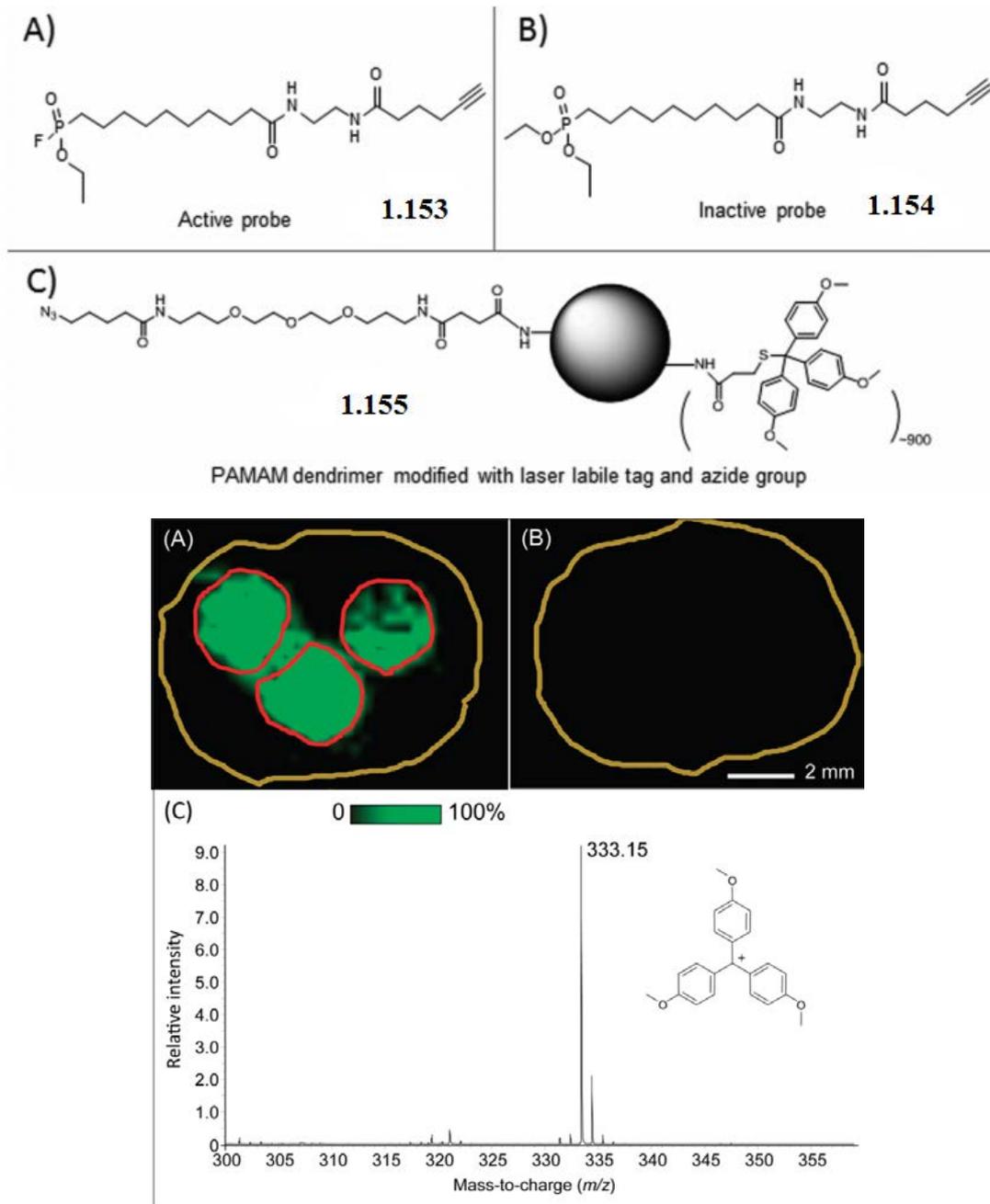
**Схема 1.4** Дериватизация и детекция отщепляемых масс-спектрометрических меток, конъюгированных с антителом.



**Рис. 1.19** Общая схема использования отщепляемых масс-спектрометрических меток в MALDI-МС-визуализации.

В работе показано мечение первичных антител, которые напрямую связывались с гистохимическими реагентами в срезе ткани поджелудочной железы, а аналитами служили синаптофизин, хромотогранин А, инсулин, кальцитонин и соматостатин (рис. 1.19).

Еще одно использование отщепляемых триметокситритильных меток в комбинации с технологией MALDI-МС-визуализации представлено в работе [338]. Авторы определяли локализацию ферментов (сериновых гидралаз) в срезах тканей млекопитающих. Соединение **1.153** избирательно связывалось с ферментом (в качестве отрицательного контроля выбрано соединение **1.154**, имеющее схожую структуру, но не связывающееся с аналитом). Полученный в результате конъюгат с терминальными алкиновыми группами вступает в реакцию циклоприсоединения с масс-спектрометрической меткой **1.155**, которая представляет собой дендример, покрытый отщепляемыми триметокситритильными группами.

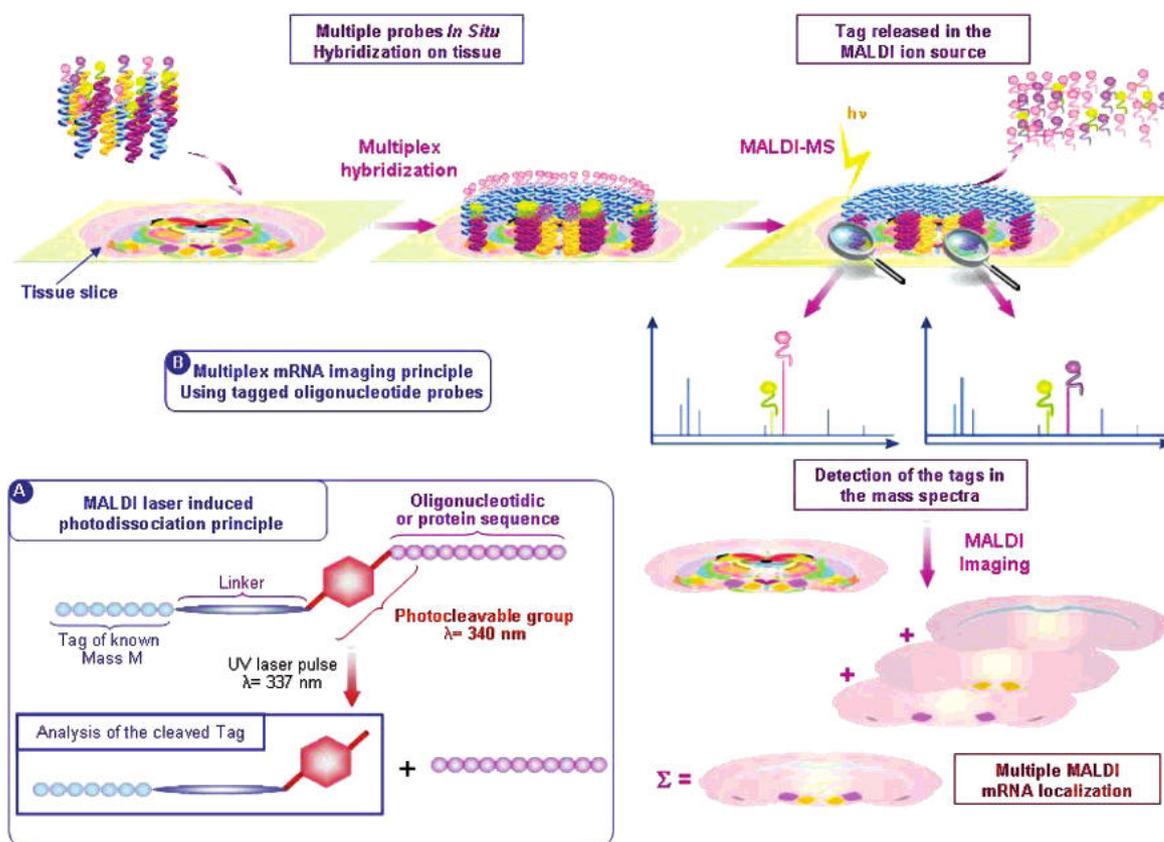


**Рис. 1.20** Распределение ферментов (сериновых гидралаз) на срезе ткани, полученное методом MALDI-МС-визуализации после дериватизации аналита (A), отрицательный контроль (при использовании для связывания с ферментом соединения **1.154**) (B). Типичный масс-спектр области, содержащей дериватизированный аналит (C).

Затем модифицированная поверхность среза ткани подвергалась масс-спектрометрическому анализу методом MALDI-МС-визуализации, и, после визуализации полученного набора масс-спектров, зарегистрированных в разных точках поверхности образца, создавалась картина распределения масс-спектрометрических меток, а следовательно – и меченых ферментов (рис. 1.20).

MALDI-МС-визуализацию с использованием масс-спектрометрических меток также применяли для быстрого, чувствительного и точного определения уровней экспрессии

мРНК или белков при различных заболеваниях [330]. Суть метода заключается в косвенном обнаружении мРНК и белков в срезе ткани с помощью фотоотщепляемой метки (репортерной группы), входящей в состав используемого зонда, высвобождении метки посредством лазерном облучения и ее детектировании в условиях MALDI. Таким примером может служить эксперимент с определением пространственного распределения мРНК. Зонд, содержащий отщепляемую масс-спектрометрическую метку, гибридизуется с комплементарной ему последовательностью мРНК, а при воздействии лазерного излучения на область специфического связывания происходит фотоотщепление линкера и десорбция масс-спектрометрической метки (рис. 1.21). При визуализации распределения мРНК в ткани области, где отсутствует мРНК-мишень, характерный сигнал метки в масс-спектре наблюдаться не будет.



**Рис. 1.21** Общая схема использования меченых зондов в MALDI-МС-визуализации.

Недавно корейские ученые предложили новую гетероциклическую структуру для отщепляемых масс-спектрометрических меток [340]. Соединения **1.156a-г** под действием лазера претерпевают разрыв связи C-S в результате чего образуются ароматические катионы **1.157a-г**. Эквимольная смесь активированных эфиров **1.156a-г** была проанализирована методом LDI-МС и было установлено, что наиболее интенсивный сигнал наблюдается в случае *n*-бутильного заместителя (рис. 1.22).

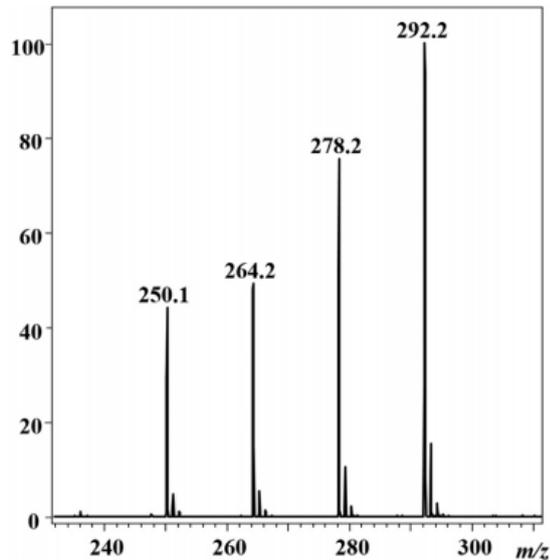
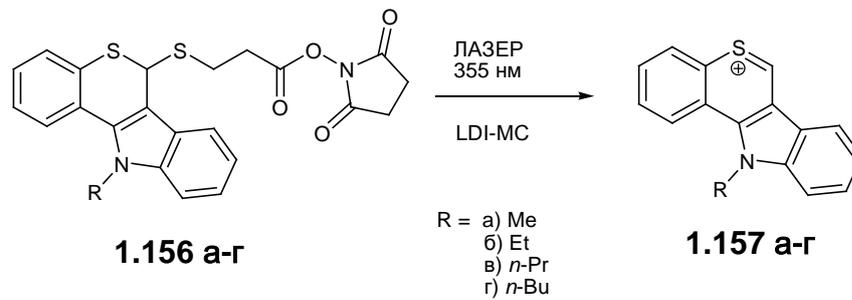
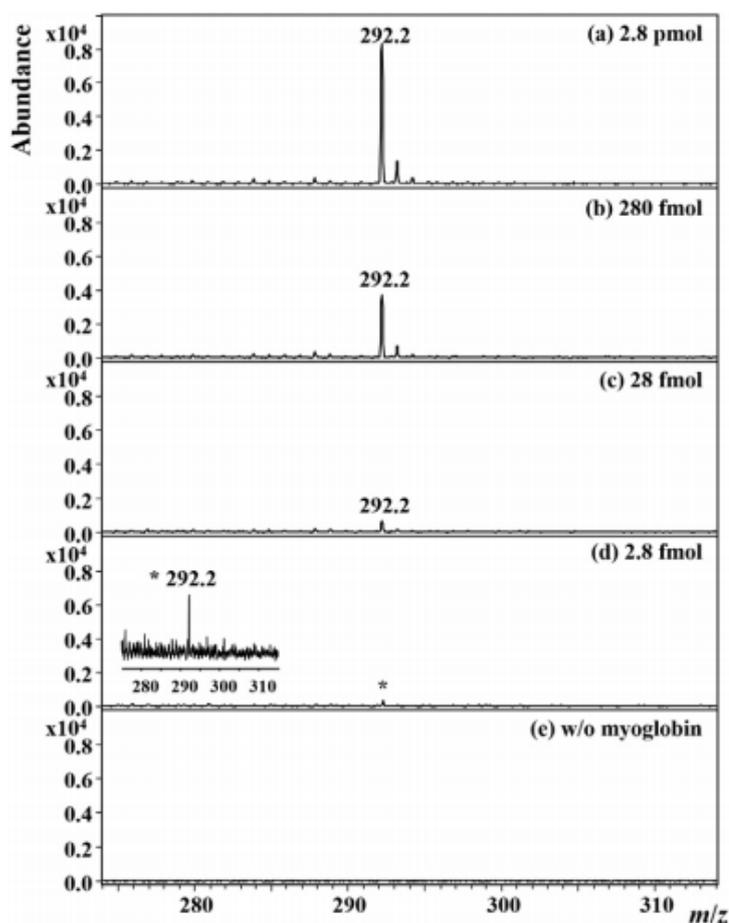


Рис. 1.22 Спектр LDI-MC эквимольной смеси **1.156 а-г**.

Масс-спектрометрическая метка **1.156г** была использована для дериватизации миоглобина. На рис. 1.23 представлены спектры LDI-MC дериватизированного миоглобина с последовательным десятикратным разбавлением. Видно, что предел обнаружения белка составляет 2.8 фмоль в ячейке мишени масс-спектрометра.

При всех достоинствах представленных масс-спектрометрических меток **1.156а-г** нельзя не отметить один серьезный недостаток данной модели: сайт вариации масс (**R**) вводится на начальных стадиях синтеза метки, поэтому процесс создания библиотек подобных масс-спектрометрических меток может оказаться довольно времязатраной и трудоемкой работой.



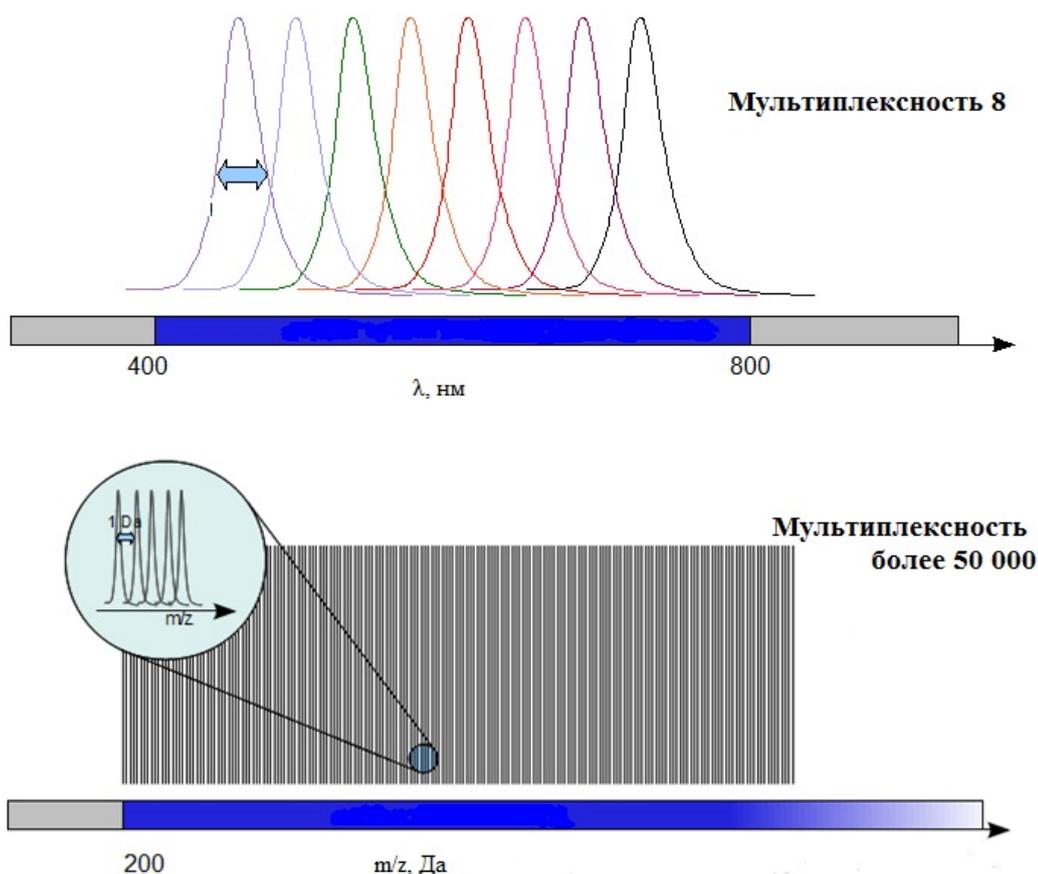
**Рис. 1.23** Спектры LDI-МС дериватизированного масс-спектрометрической меткой **1.156г** миоглобина в различных концентрациях (на рисунках указано количество вещества, наносимое в ячейку мишени масс-спектрометра). (е) отрицательный контроль (в отсутствие миоглобина).

В заключение необходимо отметить, что дериватизация масс-спектрометрическими метками является очень удобным инструментом, который может быть использован для аналитических целей в различных областях научных исследований. Несмотря на то, что этот подход начал применяться относительно недавно, неотщепляемые масс-спектрометрические метки заняли достойное место в арсенале ученых, занимающихся протеомными и метаболомными исследованиями. Постоянно выходят в свет актуальные публикации, в которых описываются все новые и новые структуры, обладающие более совершенными свойствами. Отщепляемые масс-спектрометрические метки пока не столь распространены, однако мы уверены, что в самом ближайшем будущем они также найдут широкое применение благодаря своим уникальным мультиплексным свойствам. В настоящей работе мы постараемся внести свою лепту в развитие химии масс-спектрометрических меток.

## Глава 2. Химия ионогенных масс-спектрометрических меток (Результаты и обсуждение)

### 2.1. Отщепляемые масс-спектрометрические метки

Мечение биомолекул специальными молекулами-метками (радиоактивными, флуоресцентными, масс-спектрометрическими) позволяет одновременно анализировать несколько объектов в ходе одного эксперимента. Наибольшую популярность получило использование флуоресцентных меток [341], однако, несмотря на их широкое распространение и относительную коммерческую доступность, флуоресцентные метки имеют один важный недостаток – их максимальная мультиплексность ограничена использованием не более восьми различных молекул в одной пробе.



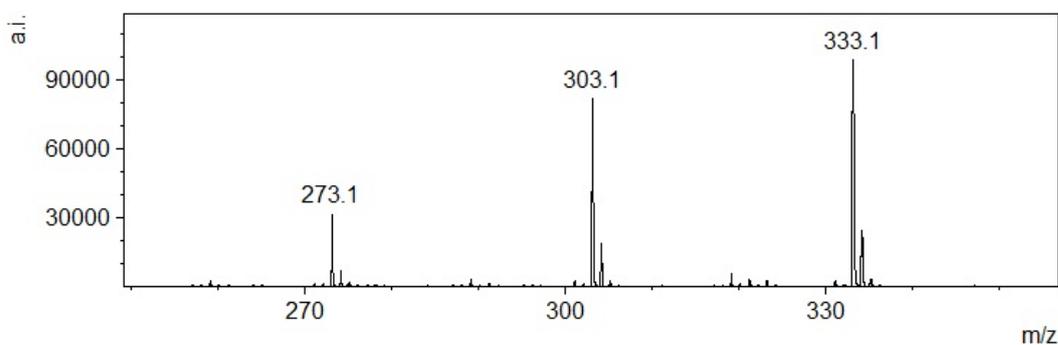
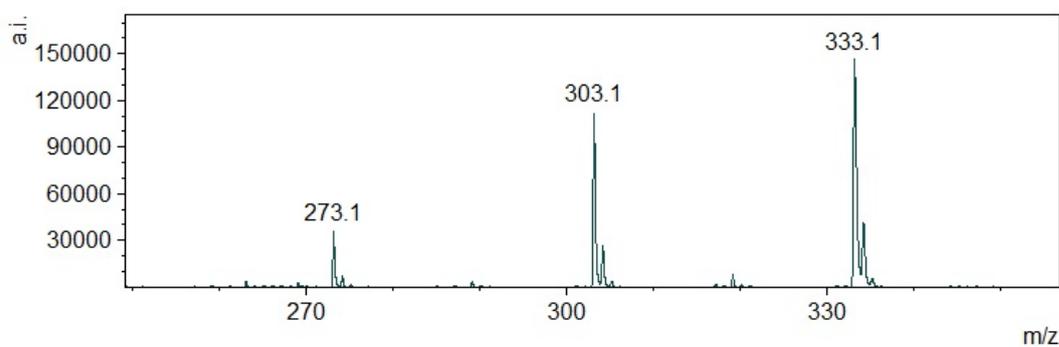
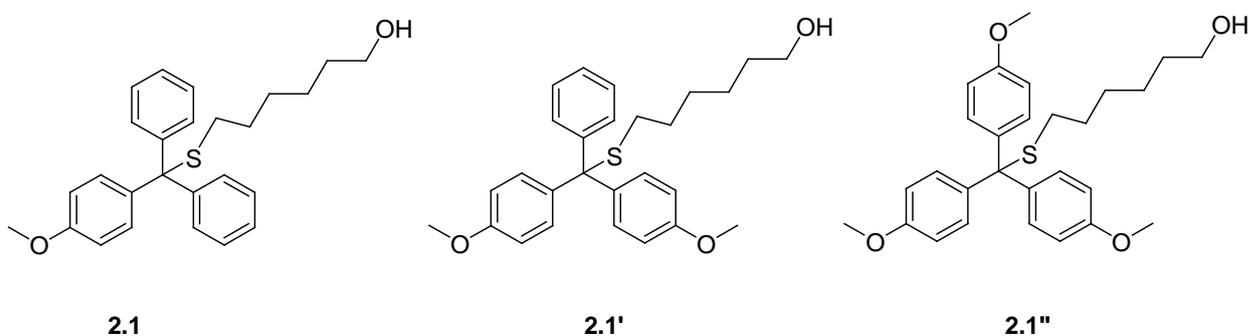
Этого недостатка лишены масс-спектрометрические метки, поскольку современные приборы позволяют надежно различать сигналы даже с разницей в 1 Да, поэтому мультиплексность исследований можно повысить на порядки. Другим преимуществом масс-спектрометрических меток служит более высокая чувствительность эксперимента.

#### 2.1.1 Отщепляемые масс-спектрометрические на основе тритильного катиона

Поскольку масс-спектрометрическая метка – это прежде всего легко ионизируемая молекула, при выборе модельного субстрата мы отталкивались от наиболее простого

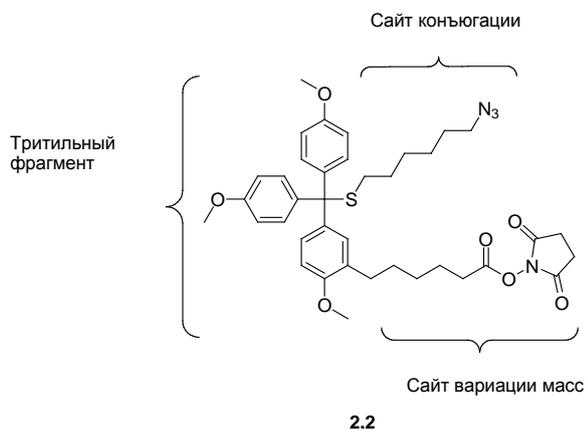
трифенилметильного катиона. В литературе можно найти работы по исследованию свойств производных триарилметилиевых катионов (в том числе и в нашей лаборатории) [202, 334, 335, 337, 338, 342–345]. Было показано, что интенсивность сигнала катиона в масс-спектре коррелирует с увеличением стабильности карбокатиона за счет увеличения числа метокси-групп, обладающих  $+M$ -мезомерным эффектом [202] (см. обзор литературы рис. 1.15).

Однако следствием такой высокой способности к гетеролитической диссоциации связи С-О оказалась крайне низкая химическая стабильность данных соединений, что накладывает определенные ограничения при их использовании и хранении. Для решения этой проблемы мы предлагаем использовать соединения, в которых атом кислорода заменен на атом серы. Мы синтезировали исходные моно-, ди-, три-метоксифенилметилмеркаптогексанола (рис. 2.1)

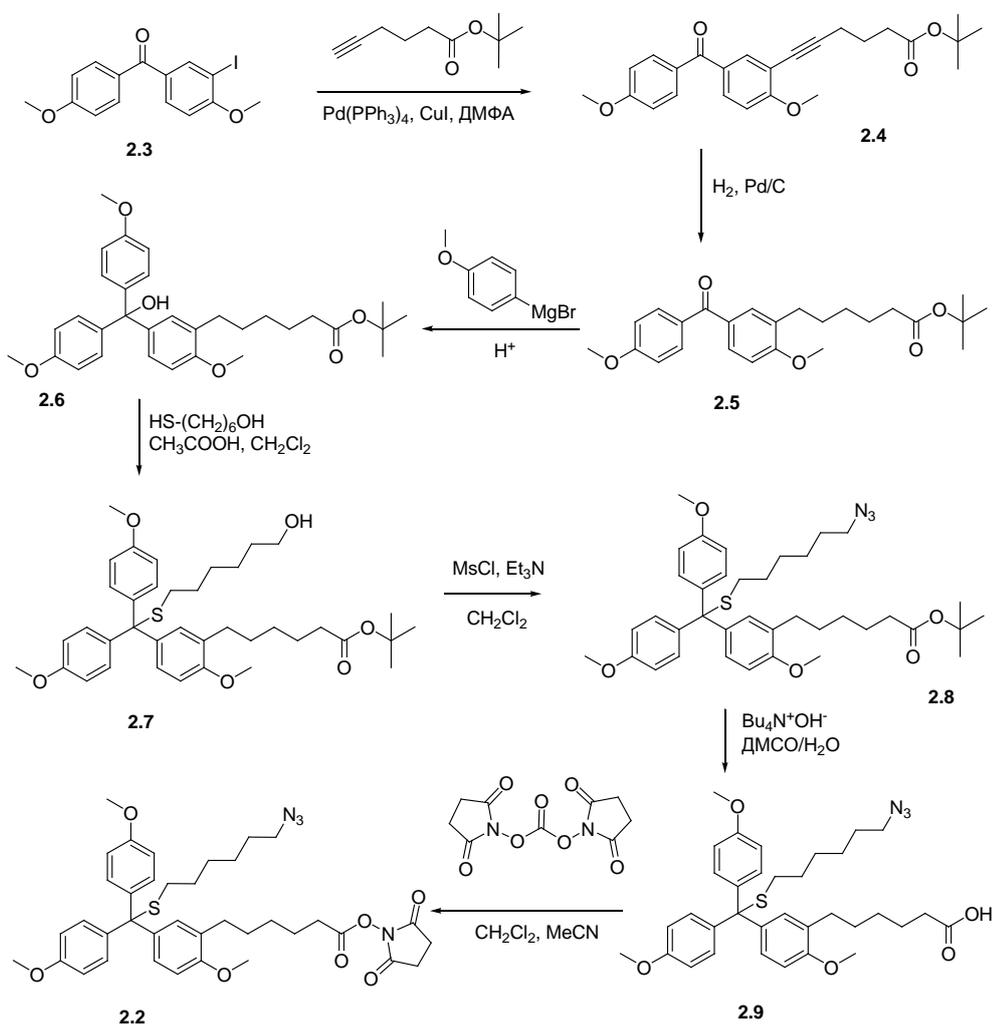


**Рис. 2.1** Спектр MALDI-МС эквимольной смеси соединений **2.1**, **2.1'**, **2.1''** (матрица – синапиновая кислота) (верхний). Спектр LDI-МС эквимольной смеси соединений **2.1**, **2.1'**, **2.1''** (нижний).

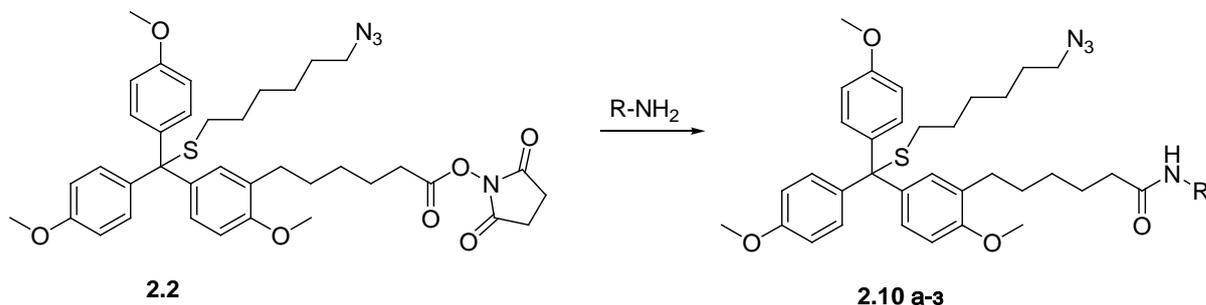
Хорошо видно увеличение интенсивности сигнала карбокатиона с увеличением его стабильности. Нами была предложена модельная молекула **2.2**, содержащая в своей структуре три основных фрагмента: собственно триметокситритильный катион, сайт конъюгации, связанный лабильной связью через атом серы с центральным углеродным атомом, и *N*-оксисукцинимидный эфир, выполняющий роль сайта вариации масс, присоединенный к 3-му атому углерода одного из фенильных колец.



Для синтеза реагента **2.2** нами была разработана и успешно реализована следующая схема:

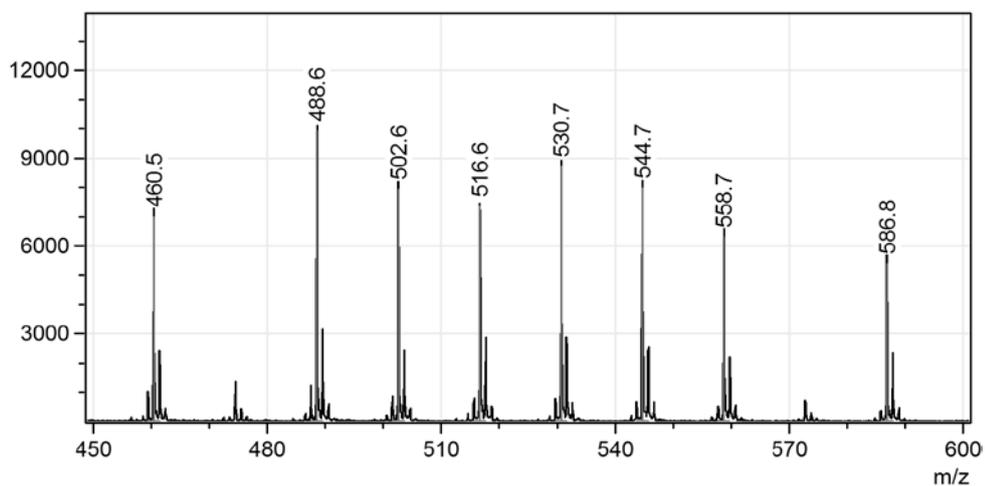
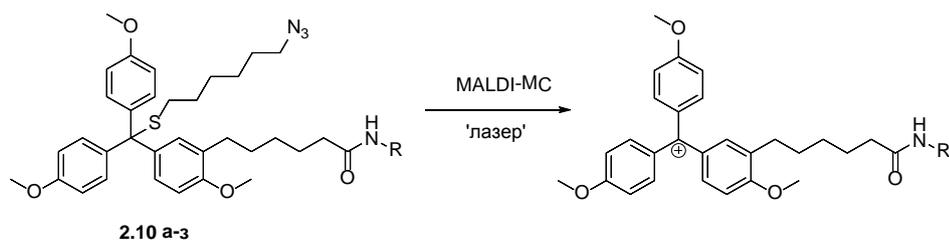


Превращения **2.3**→**2.6** осуществляли, как описано ранее [202]. Используя методы комбинаторной химии, добавляя к соединению **2.2** соответствующие амины, мы можем получать библиотеки масс-спектрометрических меток.



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 **2.10б** и **2.10г** были выделены и охарактеризованы для подтверждения структуры. В остальных экспериментах амиды **2.10** использовались без дополнительной очистки. Эквимольная смесь амидов **2.10а-з** была проанализирована методом MALDI-МС (рис. 2.2).



№	R	<i>m/z</i> регистрируемого катиона
<b>2.10а</b>	метил	460.5
<b>2.10б</b>	<i>n</i> -пропил	488.6
<b>2.10в</b>	<i>n</i> -бутил	502.6
<b>2.10г</b>	амил	516.6
<b>2.10д</b>	<i>n</i> -гексил	530.7
<b>2.10е</b>	<i>n</i> -гептил	544.7
<b>2.10ж</b>	<i>n</i> -октил	558.7
<b>2.10з</b>	<i>n</i> -децил	586.8

Рис. 2.2 Спектр MALDI-МС эквимольной смеси амидов **2.10 а-з**.

На рис. 2.2 видно, что интенсивности пиков сопоставимы, а алкильный углеводородный радикал незначительно влияет на ионизационную способность масс-спектрометрических меток.

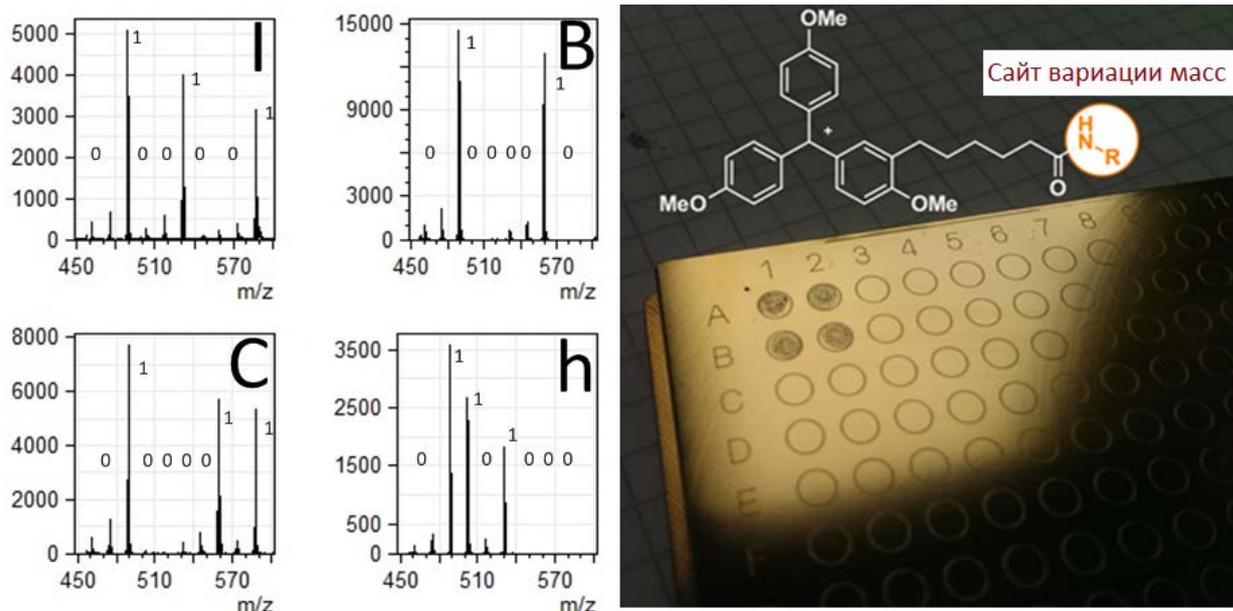
Мы предлагаем оригинальное использование библиотеки масс-спектрометрических меток для двоичного кодирования информации. Ранее в литературе упоминались попытки кодирования информации с использованием флуоресцентных свойств «металлорганических рамок» [346], однако основной проблемой остается низкая мультиплексность. Масс-спектрометрия же, благодаря своей уникальной мультиплексности, обладает огромным потенциалом для решения подобных задач. Несмотря на то, что использование масс-спектрометрических меток – это относительно новый метод в химии, уже появились работы, в которых данная технология успешно реализуется для поиска различий полимерных частиц [333], наночастиц [347], ДНК-последовательностей [348].

Для кодирования разнообразных символов (букв, знаков препинания и т.п.) используется таблица 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. 2.1). В качестве примера можно привести аббревиатуру ИБХ – буквы «I», «B», «C», «h».

**Таблица 2.1.** 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

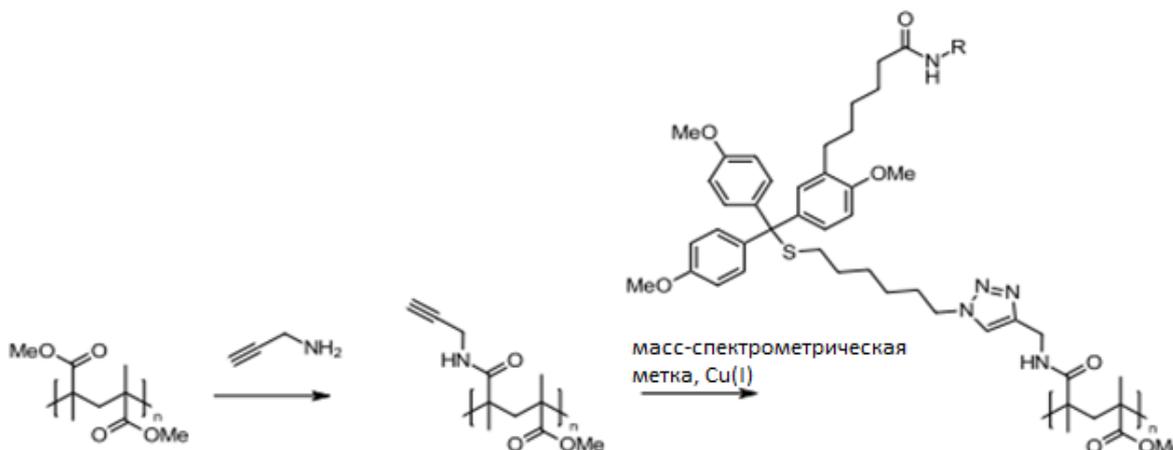
Каждому положению в двоичном коде будет соответствовать одна масс-спектрометрическая метка (рис. 2.2). Если в определенном положении стоит единица – это значит, что сигнал масс-метки есть, если ноль – соответствующий сигнал отсутствует. Например, в коде букве «I» единицы находятся во втором, пятом и восьмом положениях, следовательно масс-спектр, соответствующий букве «I», должен содержать сигналы ( $m/z$  502, 530 и 586). Смешивая эквимольные концентрации соответствующих амидов и анализируя их методом MALDI-MS, получили четыре масс-спектра, каждый из которых кодирует определенную букву (рис. 2.3).



**Рис. 2.3** 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.

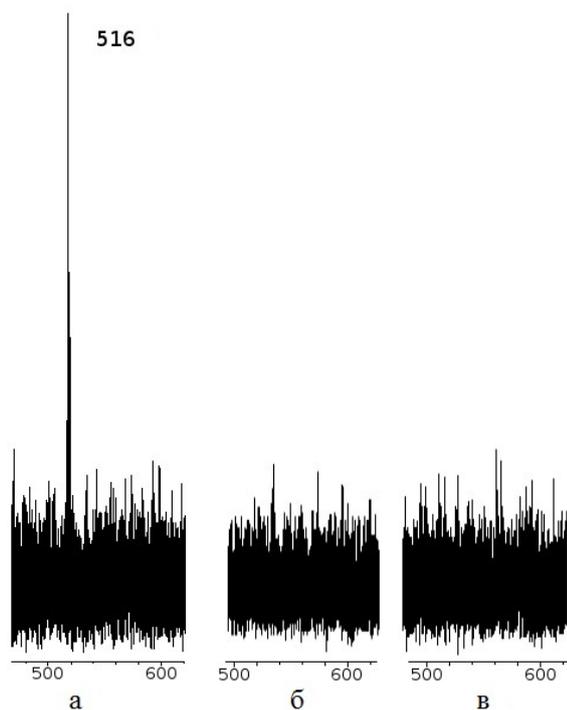
В следующем эксперименте мы показали возможность ковалентного связывания масс-спектрометрической метки с полимерной поверхностью (рис. 2.4)



**Рис. 2.4** Схема связывания масс-спектрометрической метки с алкинмодифицированным ПММА.

Полиметилметакрилат (ПММА) был модифицирован пропаргиламином (см. экспериментальную часть). Раствор алкинсодержащего полимера был нанесен на поверхность мишени масс-спектрометра. После испарения растворителя на поверхности мишени образовалась тонкая пленка полимера. Эту поверхность обработали раствором, содержащим масс-спектрометрическую метку **2.10г** и медный катализатор. При этом азидогруппа метки легко вступает в азид-алкиновое циклоприсоединение с

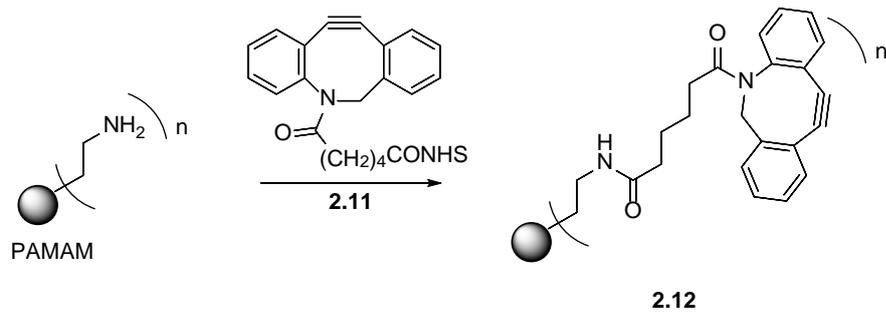
терминальными ацетиленовыми группами (реакция Хьюсена), находящимися на поверхности пленки. Анализ полученной поверхности методом LDI показал, что в масс-спектре четко виден сигнал метки ( $m/z$  516) (рис. 2.5а). Для исключения возможности нековалентного связывания метки и поверхности были проведены два эксперимента (отрицательный контроль): 1) тем же раствором обработали поверхность мишени, покрытой пленкой немодифицированного ПММА (рис. 2.5б), 2) поверхность мишени, покрытую алкинмодифицированным ПММА, обработали раствором метки **2.10г**, не содержащим медный катализатор (рис. 2.5в).



**Рис. 2.5** Детекция масс-спектрометрической метки **2.10г**, связанной с алкинмодифицированным ПММА (а). Контрольный эксперимент с немодифицированным ПММА (б) и в отсутствие медного катализа (в).

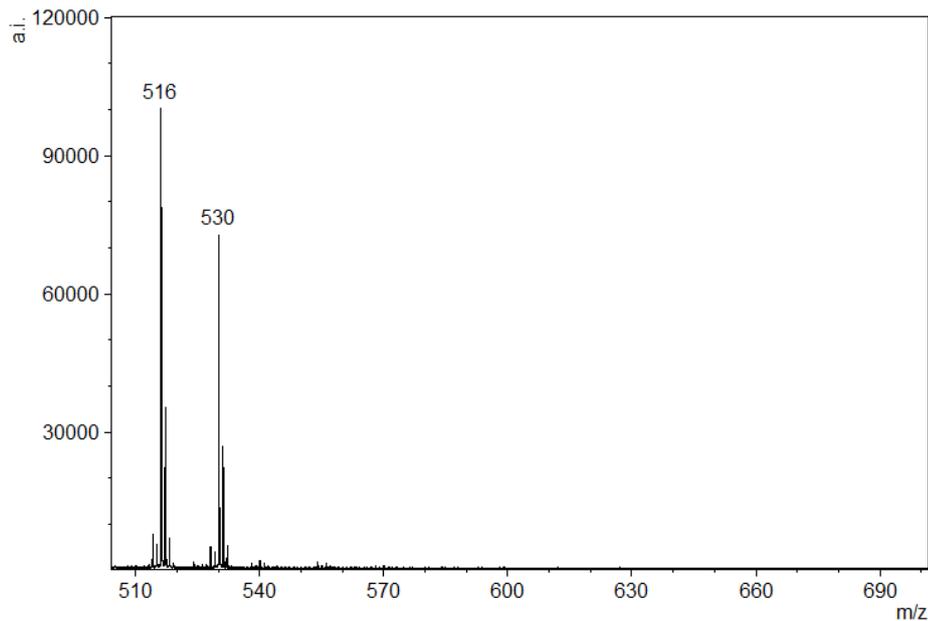
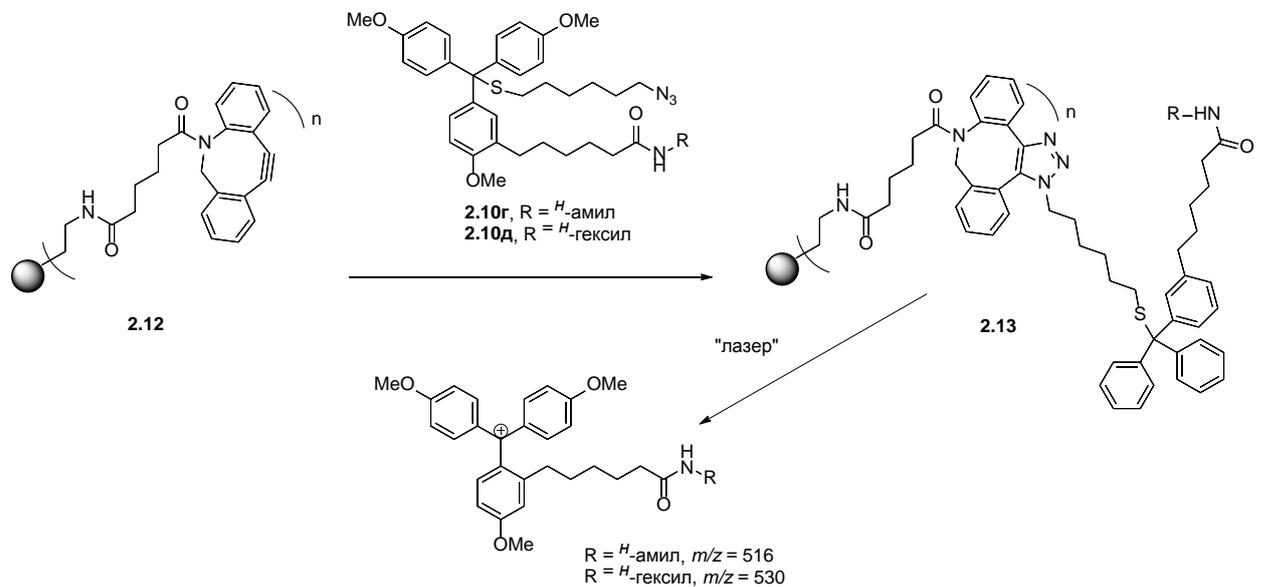
В следующей серии экспериментов мы показали возможность дериватизации циклооктинмодифицированного РАММ-дендримера (полиамидоамин) масс-спектрометрическими метками с помощью «безмедной» реакции [3+2]-циклоприсоединения [349] и последующим определением меток методом MALDI-МС.

РАММ-дендример представляет собой шарообразное полимерное ядро, на поверхности которого находятся первичные аминогруппы, связанные через короткий  $-(CH_2CH_2)-$  линкер (рис. 2.6). Использование в качестве модифицирующего агента *N*-гидроксисукцинимидного эфира 6-(11,12-дидегидродибензо[b,f]азоцин-5(6*H*))ил)-6-оксогексановой кислоты **2.11** позволяет получать дендример **2.12**, содержащий стабилизированный циклооктиновый фрагмент.



**Рис. 2.6** Модификации PAMAM-дендримера циклооктином.

Предварительно полученные амиды **2.10г** и **2.10д** были введены в реакцию с соединением **2.12**, и, после высаживания образовавшихся конъюгатов **2.13**, их проанализировали методом (МА)LDI-МС (рис. 2.7).



**Рис. 2.7** Дериватизация соединения **2.12** масс-спектрометрическими метками **2.10г** и **2.10д**, спектр LDI-МС конъюгатов **2.13**

Как видно на рис. 2.7, спектры LDI-МС конъюгатов **2.13** содержат четкие, интенсивные пики тритильных катионов (остатков масс-спектрометрических меток с соответствующими  $m/z$  516 для катиона с *n*-амильным радикалом,  $m/z$  530 для катиона с *n*-гексильным радикалом). В качестве контрольного эксперимента (для исключения нековалентного связывания метки с модифицированным ПАММ-дендримером) дендример **2.12** был обработан избытком бензилазида и, после выделения, конъюгат **2.14**, был введен в реакцию с масс-спектрометрической меткой **2.10в** (рис. 2.8).

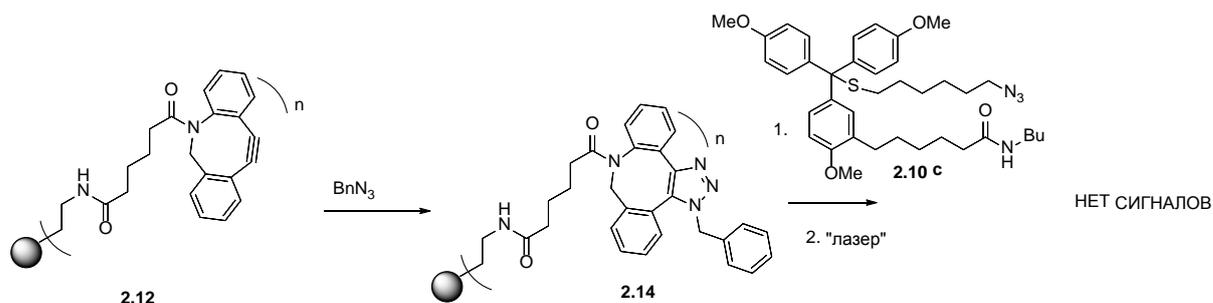


Рис. 2.8 Контрольный эксперимент по «эпированию» циклооктина на дендримере.

После обработки ацетоном реакционной смеси и анализа выпавшего остатка методом MALDI-МС в масс-спектре не было сигналов, соответствующих масс-спектрометрической метке **2.10в**. Отсюда можно сделать вывод, что связывание масс-спектрометрической метки с модифицированным дендримером происходит только посредством реакции циклоприсоединения.

Ещё одним удобным аналогом триарилметильного катиона служит пиксильный катион, коммерчески доступный в виде 9-фенил-9*H*-ксантен-9-ола **2.15**. Ранее была опубликована работа по исследованию масс-спектрометрических свойств пиксильного катиона, связанного с линкером функционализированных соединений через атом кислорода [336]. Однако такие соединения также отличаются невысокой химической стабильностью. Нами был предложен двухстадийный способ получения из спирта **2.15** азида **2.17**, в котором пиксильный фрагмент соединен с реакционноспособной азидогруппой через тиогексильный линкер (рис. 2.9).

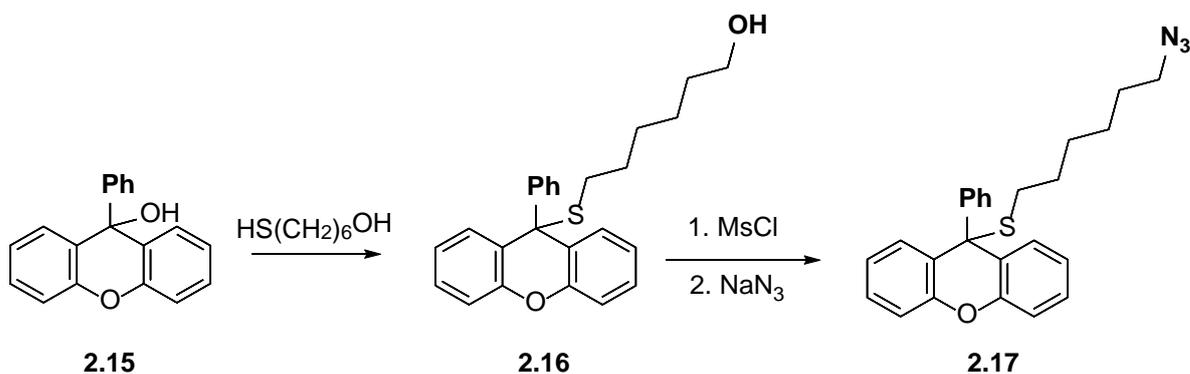
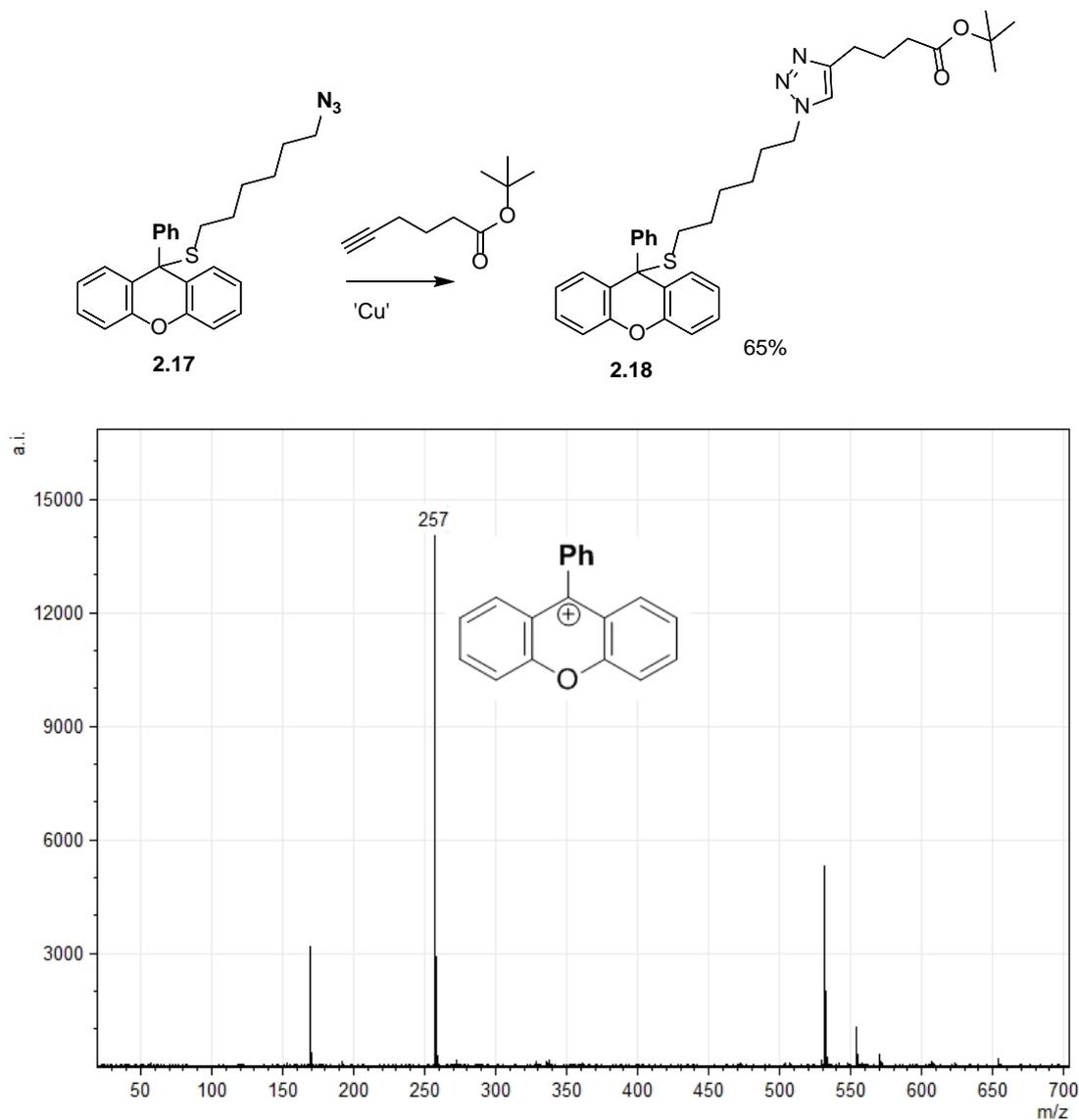


Рис. 2.9 Синтез масс-спектрометрической метки **2.17**.

Для демонстрации возможностей метода мы провели реакцию Хьюсена азида **2.17** с трет-бутиловым эфиром гексин-5-овой кислоты, в результате которой с хорошим выходом было получено соединение **2.18**, масс-спектр которого содержит четкий пик ( $m/z$  257), соответствующий пиксильному катиону (рис. 2.10).



**Рис. 2.10** Схема реакции циклоприсоединения масс-спектрометрической метки **2.17** и трет-бутилового эфира гексин-5-овой кислоты, масс-спектр LDI-МС соединения **2.18**

Таким образом, мы предлагаем удобный и простой метод получения библиотек масс-спектрометрических меток на основе универсального реагента **2.2** и его аналогов. Кроме того, мы показали возможности применения таких библиотек для кодирования информации и «мечения» полимерных поверхностей и дендримеров. Такое «высокомультимплексное» кодирование может использоваться для шифрования информации в растворах, а также для дериватизации поверхностей с целью (отслеживания) установления вида материалов, контроля качества и идентификации подделок.

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

Как было сказано выше, необходимым компонентом отщепляемой масс-спектрометрической метки должна быть стабильная заряженная частица, которая может легко детектироваться в условиях масс-спектрометрического анализа. Согласно правилу Хюккеля, моноциклическая плоская система будет ароматичной (т.е. обладать повышенной стабильностью), если в её состав входят  $(4n + 2)$   $\pi$ -электронов (рис. 2.11). Простейшей заряженной частицей, удовлетворяющей этим условиям, является катион циклопропенилия  $C_3H_3^+$  [350].

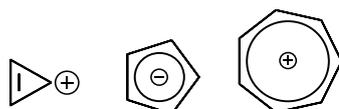


Рис 2.11 Простейшие заряженные ароматические системы.

Замещение атомов водорода в катионе циклопропенилия на арилы увеличивает его стабильность [351]. В литературе можно найти ряд обзоров и важных публикаций, касающихся синтеза, химических и физико-химических свойств производных триарилциклопропенилиевых катионов [352–361]. Также нельзя не упомянуть работы патриарха химии циклопропенилиевого катиона Рональда Бреслоу, в которых впервые удалось синтезировать производные трифенилциклопропенилиевого катиона [362, 363]. Основные подходы к синтезу триарилциклопропенилиевого катиона представлены на рис. 2.12.

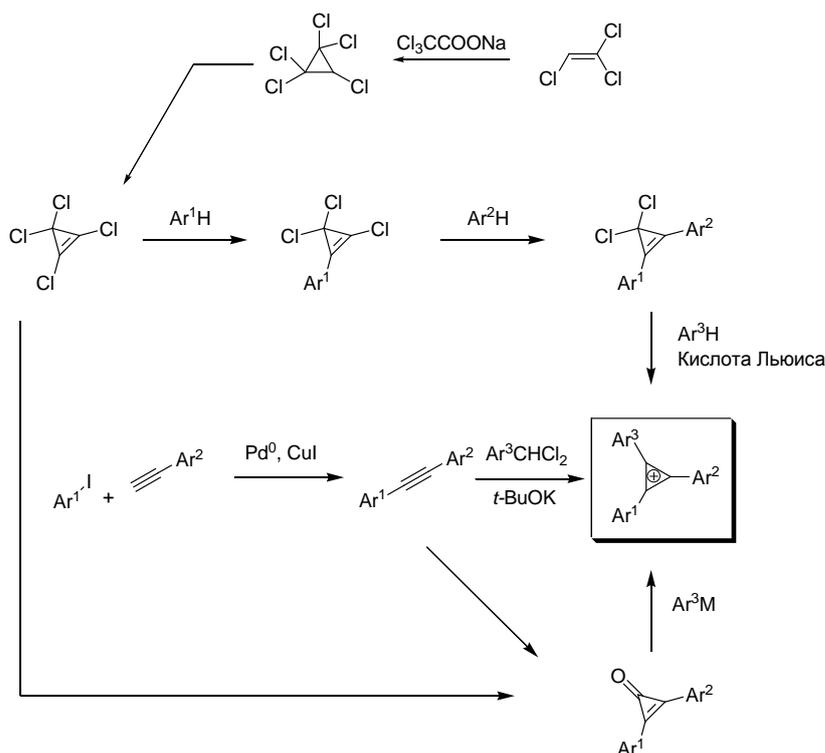
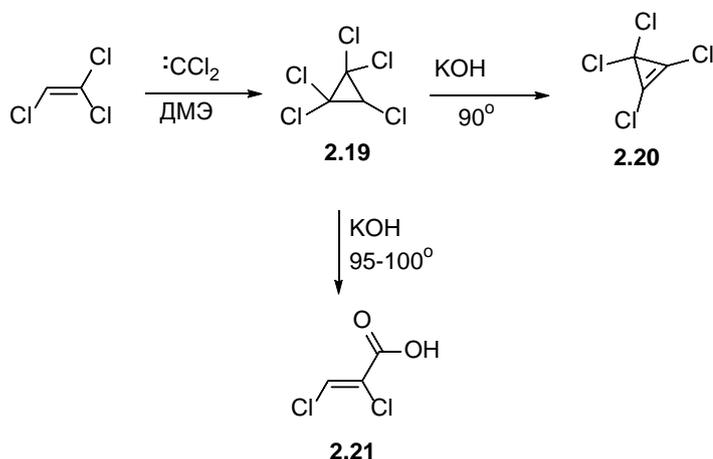


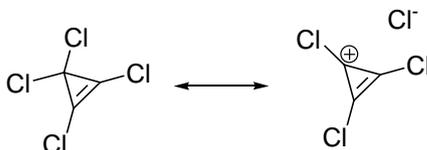
Рис. 2.12 Основные пути синтеза триарилциклопропенилиевого катиона.

Как видно из рисунка 2.12, основным прекурсором для синтеза триарилциклопропенилиевого катиона служит тетрахлорциклопропен **2.20**, который мы получали из трихлорэтилена (рис. 2.13) [364]. На первой стадии трихлорэтилен реагирует с дихлоркарбеном, получаемым *in situ* из трихлорацетата натрия. Реакция идет несколько дней и с небольшим выходом, однако, ввиду доступности реагентов, этот метод можно признать удовлетворительным для получения пентахлорциклопропана **2.19**.



**Рис. 2.13** Синтез тетрахлорциклопропена.

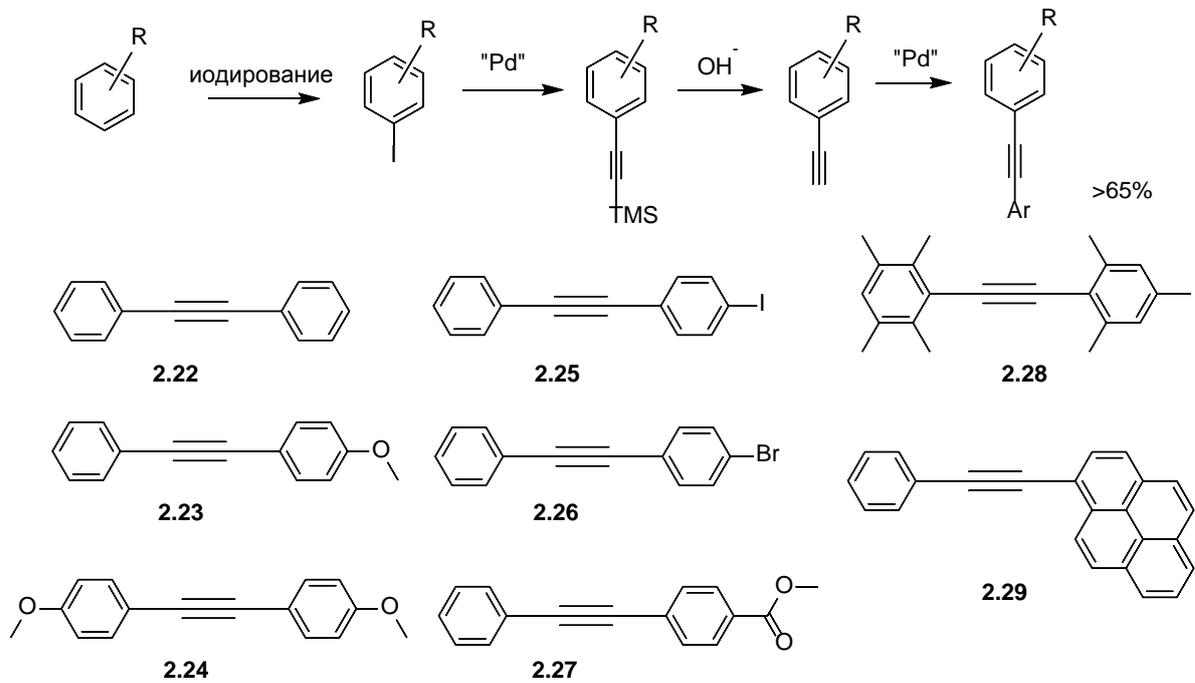
На следующей стадии проводили реакцию элиминирования HCl. Здесь нужно обратить внимание на необходимость соблюдения температурного режима, т.к. при увеличении температуры даже на 5–10° С количественно выделяли вещество **2.21**.



**Рис. 2.14** Граничные структуры тетрахлорциклопропена.

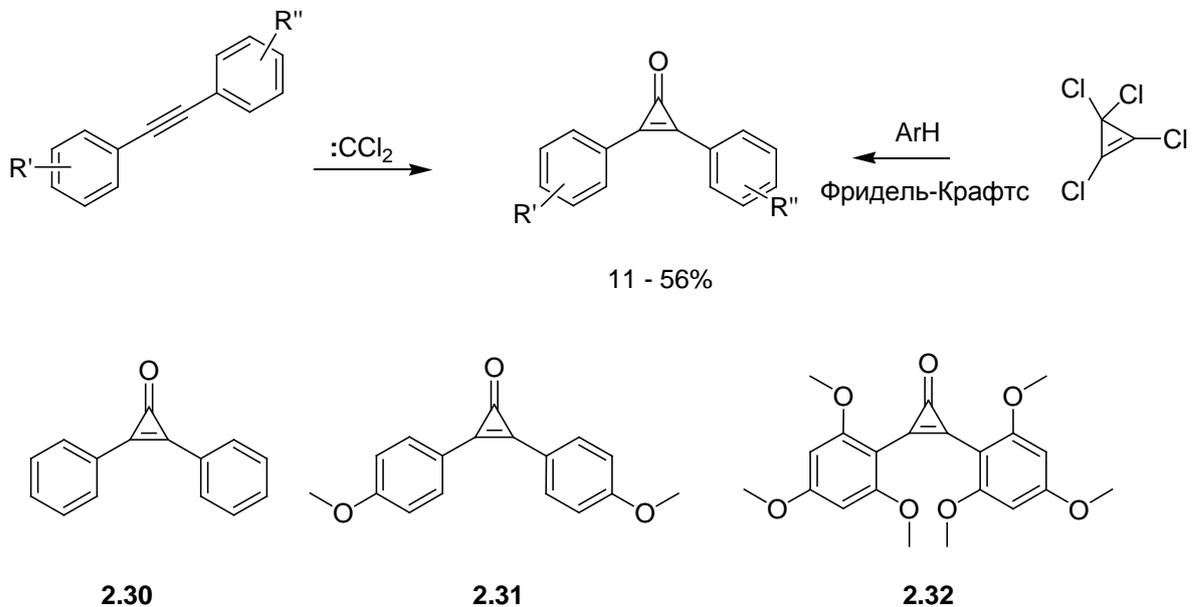
Тетрахлорциклопропен является удобным электрофильным субстратом (рис. 2.14) и легко вступает в реакцию Фриделя-Крафтса (рис. 2.12) как напрямую, с образованием триарилциклопропенилиевого катиона, так и через промежуточный субстрат диарилциклопропенон [365–368].

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 (рис. 2.15).

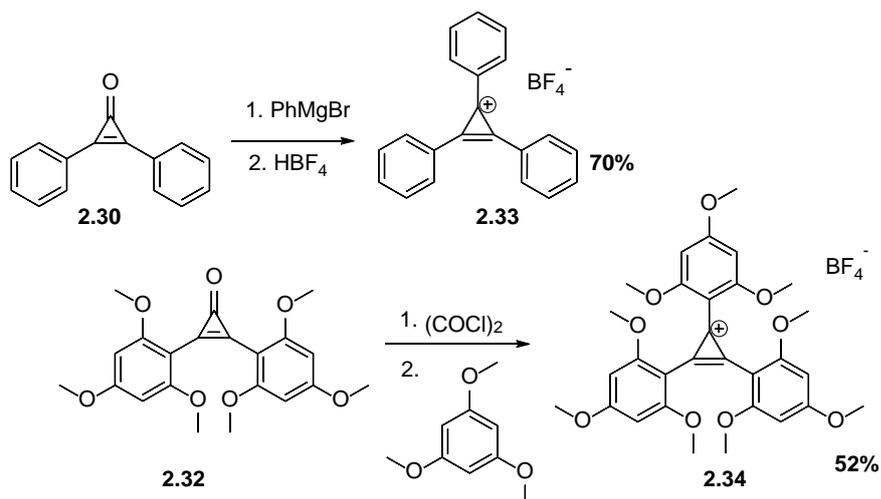


**Рис. 2.15** Синтезов несимметричных диарилацетиленов.

Полученные диарилацетилены, как и тетрахлоциклопропен, могут быть использованы для синтеза диарилциклопропенонов (рис. 2.16). Далее, действуя на полученные арилзамещенные циклопропенильные кетоны реактивом Гриньяра, литийорганическими соединениями, или путем реакции Фриделя–Крафтса можно получать триарилциклопропенилиевые катионы (рис. 2.17).

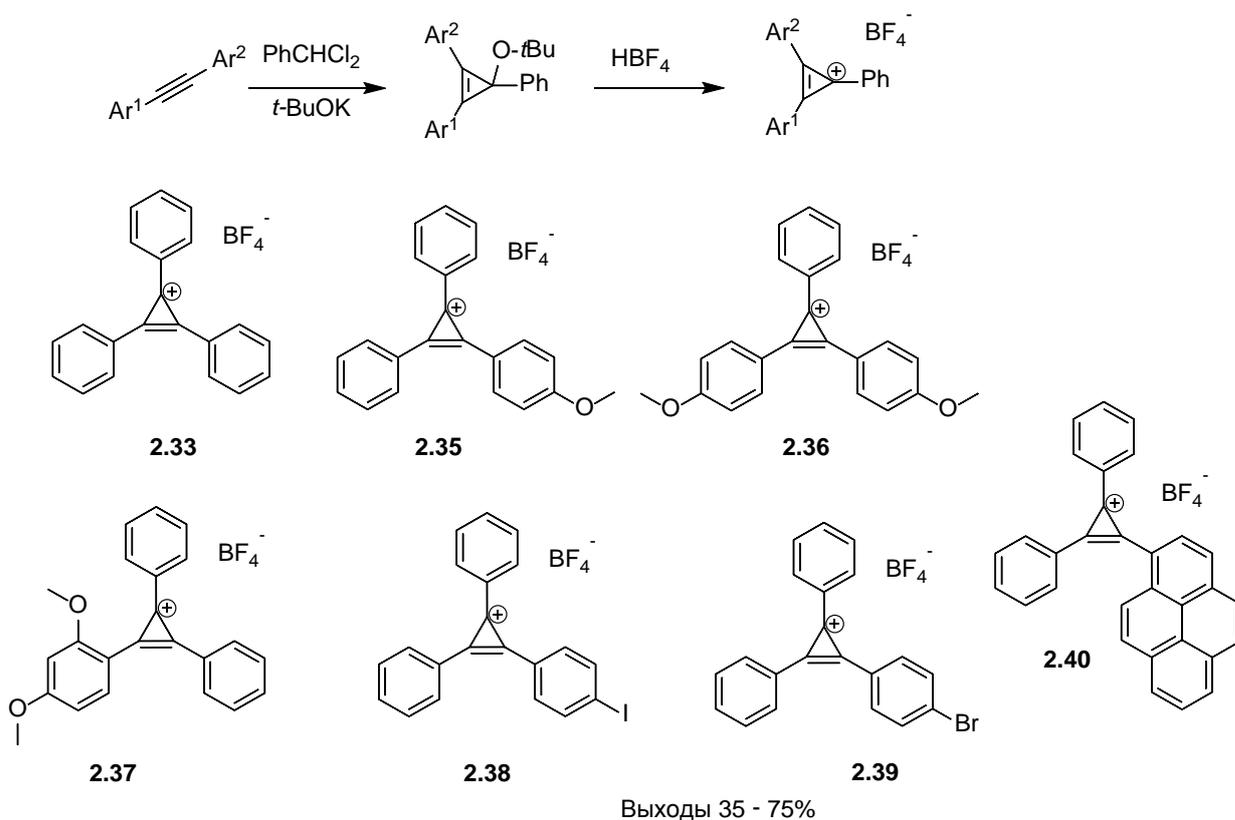


**Рис. 2.16** Общая схема синтеза диарилциклопропенонов.



**Рис. 2.17.** Синтез триарилциклопропенилиевых катионов из дифенилциклопропенонеров.

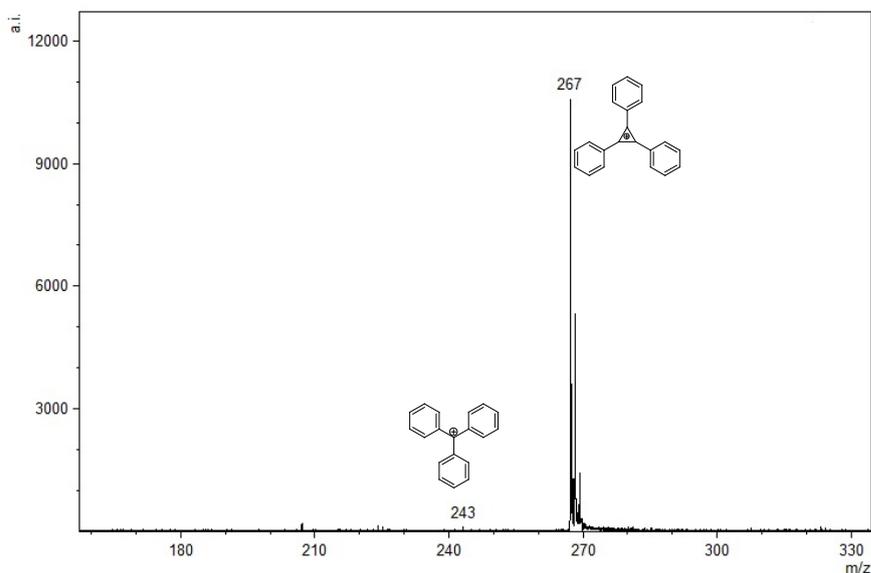
Однако, на наш взгляд, наиболее удобным является прямой метод синтеза триарилциклопропенилиевого катиона из диарилацетиленов [369] (рис. 2.18). Соединения **2.33-2.40** были синтезированы, охарактеризованы, для них были зарегистрированы спектры MALDI-МС. Во всех случаях мы наблюдали интенсивный сигнал соответствующего катиона (см. приложение).



**Рис. 2.18** Синтез триарилциклопропенилиевого катиона из диарилацетиленов и бензилидендихлорида и структуры синтезированных катионов.

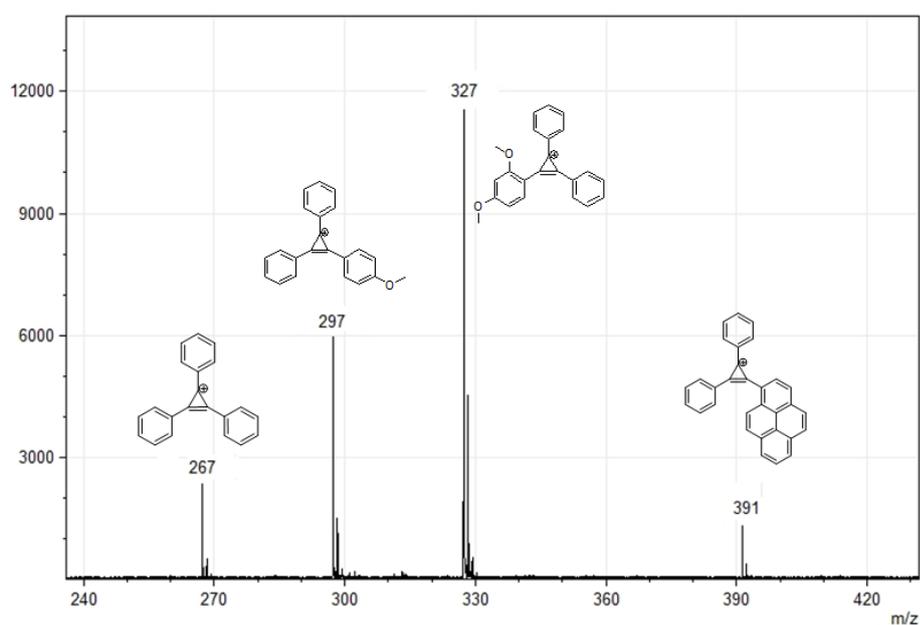
Ароматический трифенилциклопропенилиевый катион намного стабильнее соответствующего тритильного катиона ( $\text{pK}_{\text{R}^+}$  3.1 и -6.6 соответственно) [370]. Этот факт

находит и масс-спектрометрическое подтверждение; при анализе эквимольной смеси  $\text{Tr}^+$  и  $\text{C}_3\text{Ph}_3^+$  сигнал тритильного катиона нивелируется интенсивным сигналом катиона циклопропенилия и, только увеличив концентрацию тритильного катиона, удается зарегистрировать едва заметный его сигнал по сравнению с трехчленным аналогом (рис. 2.19).



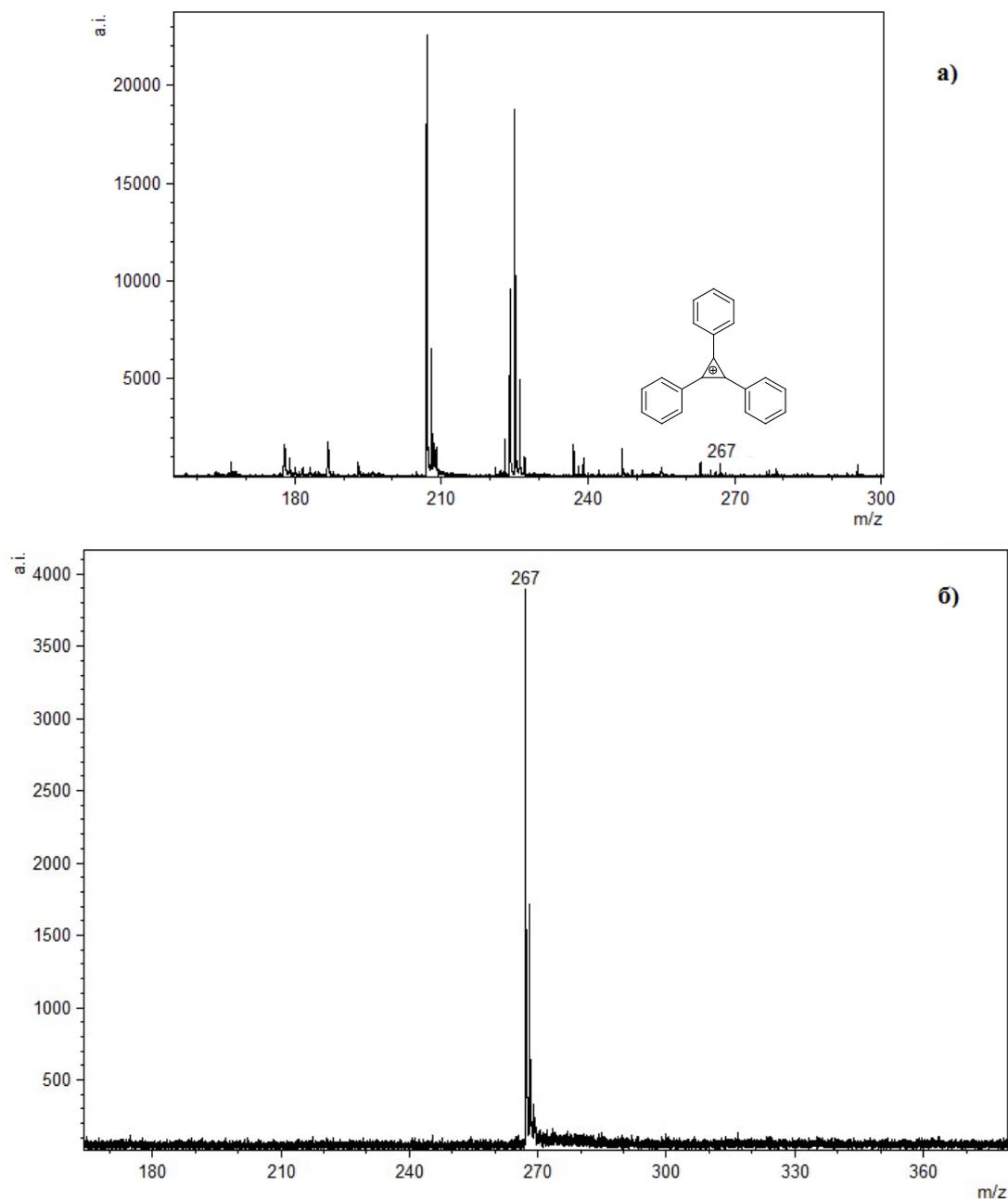
**Рис. 2.19** Сравнение интенсивностей  $\text{Tr}^+$  ( $2 \cdot 10^{-2}$  M) и  $\text{C}_3\text{Ph}_3^+$  ( $4 \cdot 10^{-3}$  M) при одновременном присутствии в образце методом LDI.

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 (рис. 2.20).



**Рис. 2.20** Спектр MALDI-МС эквимольной смеси соединений **2.33**, **2.35**, **2.37** и **2.40** (матрица – синапиновая кислота).

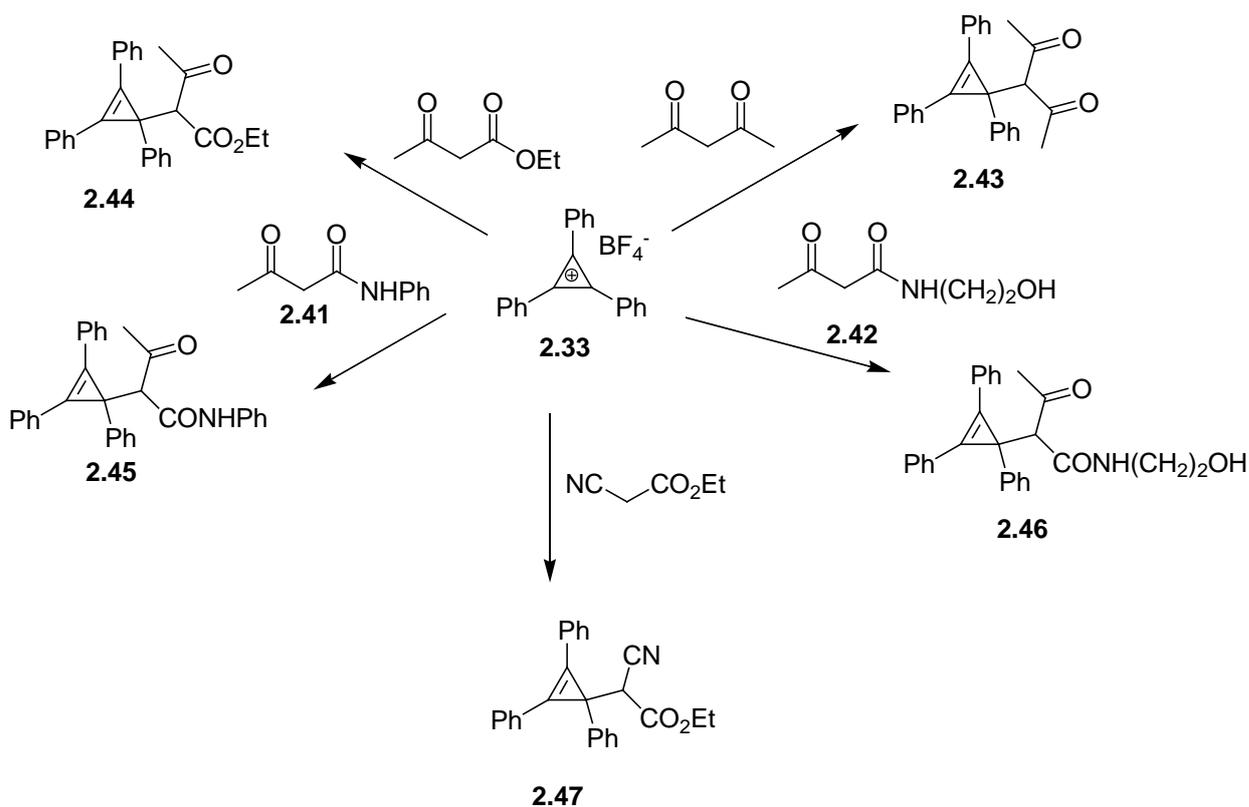
Для соединения **2.33** был определен нижний предел детекции методом MALDI-МС ( $1 \cdot 10^{-11}$  моль в ячейке мишени масс-спектрометра) и методом LDI-МС ( $1 \cdot 10^{-9}$  моль в ячейке мишени масс-спектрометра) (рис. 2.21).



**Рис. 2.21** Нижний предел детекции соединения **2.33** методом MALDI-МС (матрица-CHCA) (а) и методом LDI-МС (б).

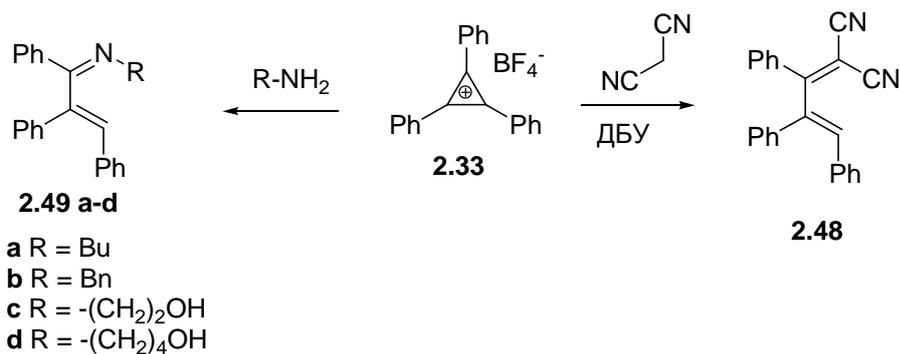
Для исследования ионизации ковалентных производных трифенилциклопропенилиевого катиона, мы синтезировали ряд соединений *C*-, *N*- и *S*-замещенных трифенилциклопропен-3-ильных производных. Связь С-С является довольно прочной, что несомненно должно улучшить химическую стабильность масс-спектрометрической метки. Однако с другой стороны, эта связь должна легко разрываться

в условиях масс-спектрометрического анализа, поэтому в структуры синтезируемых соединений мы ввели электроноакцепторные функциональные группы (рис. 2.22).



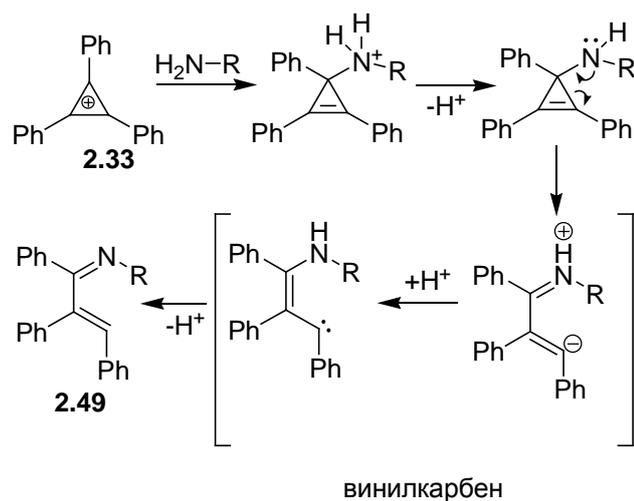
**Рис. 2.22** Синтез *C*-производных циклопропенилиевого катиона реакциями с *C*-нуклеофилами.

Интересные результаты мы получили при попытке использовать в качестве нуклеофилов анион малононитрила и первичные амины: в этих реакциях наблюдается раскрытие трехчленного цикла с образованием соединений **2.48**, **2.49a-d** (рис. 2.23). Строение этих соединений доказано методами двумерной ЯМР-спектроскопии.



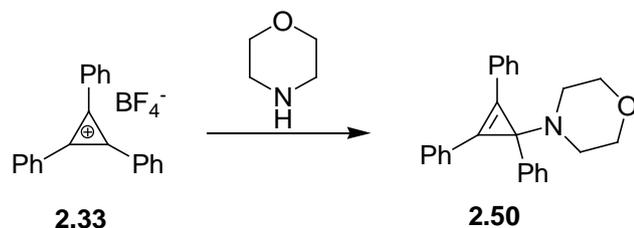
**Рис. 2.23** Взаимодействие трифенилциклопропенилиевого катиона с малононитрилом и первичными аминами.

В литературе есть примеры похожих реакций раскрытия трехчленных циклов, содержащих в качестве заместителя в циклопропенилиевом цикле хорошо уходящую группу [371–379]. Мы предполагаем, что в нашем случае реализуется предложенный ранее винил-карбениевый механизм (рис. 2.24).



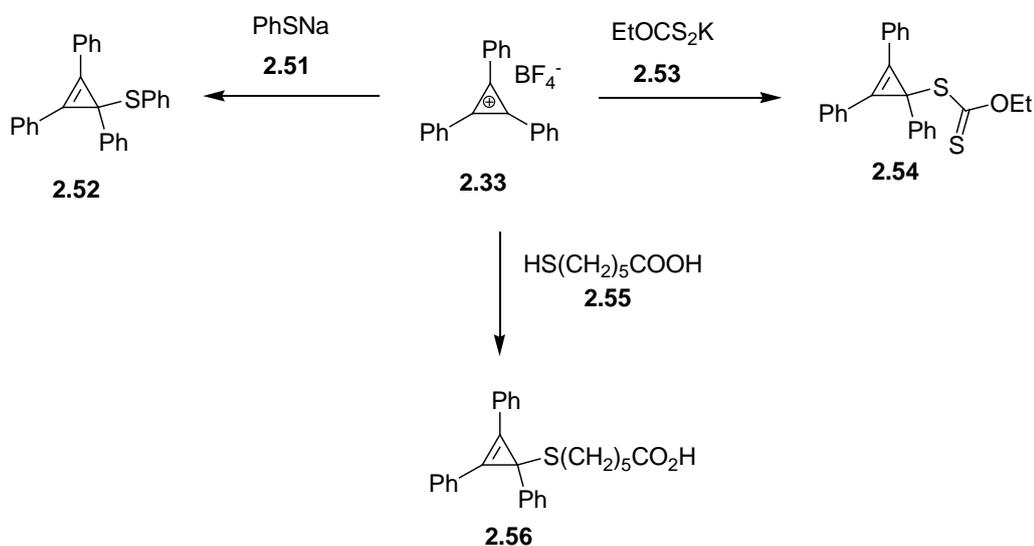
**Рис. 2.24** Предполагаемый механизм винил-карбениевой перегруппировки.

При реакции морфолина с трифенилциклопропенилиевым катионом раскрытие цикла не наблюдалось, был получен продукт **2.50** (рис. 2.25).



**Рис. 2.25** Синтез морфолинового производного **2.50**.

Еще одна серия синтезированных нами соединений – *S*-связанные производные циклопропенилиевого катиона (рис. 2.26). Поскольку алкокси-производные циклопропенилиевого катиона крайне неустойчивы, то, по аналогии с тритильным катионом, мы предположили увеличение химической стабильности этих соединений при замене в них атома кислорода на серу.



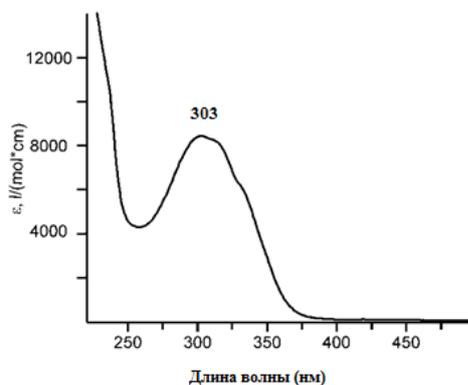
**Рис. 2.26** Синтез *S*-связанных производных циклопропенилиевого катиона.

Полученные *C*-, *N*- и *S*-связанные трифенилциклопропен-3-ильные производные были проанализированы методом MALDI-МС (табл. 2.1).

**Таблица 2.1** Данные по относительной интенсивности сигналов производных трифенилциклопропенилиевого катиона в спектрах MALDI-МС. (Матрица – синапиновая кислота).

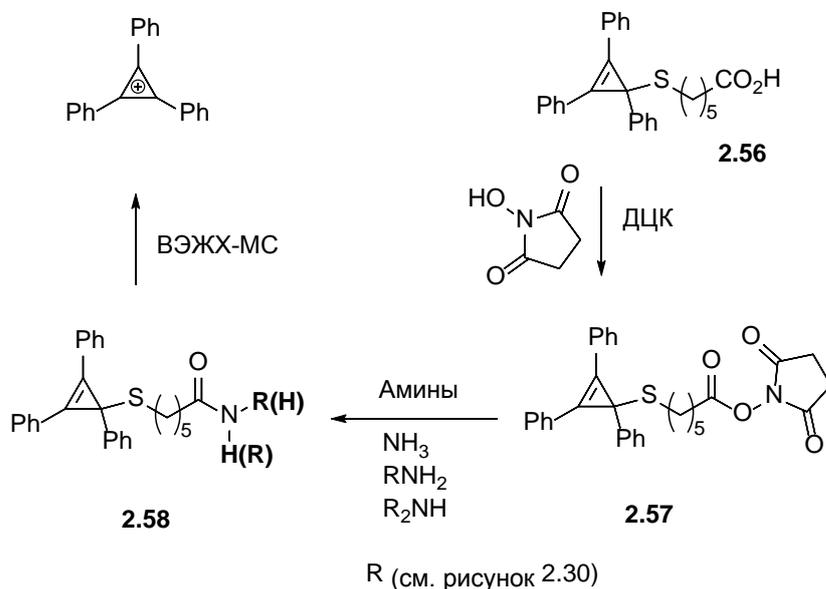
#	Относительная интенсивность сигналов ионов, %		
	$\text{Ph}_3\text{C}_3^+$ , 267 Да	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Другие ионы
2.50	100	64	–
2.43	100	–	92 [M–Ac]
2.44	100	–	47 [M–OMe], 62 [M–CO <sub>2</sub> Et]
2.47	19	100	12 [M–OEt]
2.45	100	–	8 [M–Ac], 5 [M–CONHPh]
2.46	100	–	73 [M–Ac], 21 [M–CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH]
2.52	100	–	–
2.54	100	–	–
2.56	100	–	–

Из таблицы 2.1 видно, что в масс-спектрах всех соединений (кроме **2.47**) содержится пик 267 Да, соответствующий катиону  $\text{C}_3\text{Ph}_3^+$ , однако только в серосодержащих молекулах отсутствуют другие пики, что является важным преимуществом, поскольку отщепляемые масс-спектрометрические метки должны давать один четкий сигнал. Наличие фрагментации сильно усложняет интерпретацию сложных спектров. При исследовании этих же соединений методом LDI-МС, также наилучший результат показало соединение **2.56**. Видимо, это можно объяснить ещё и тем фактом, что максимум поглощения в УФ-области соединения **2.56** (рис. 2.27) примерно соответствует длине волны лазера масс-спектрометра (337 нм).



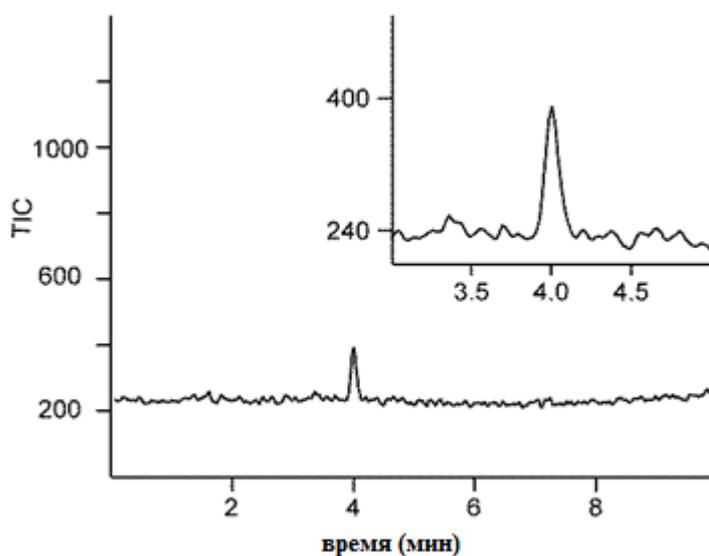
**Рис. 2.27** Спектр поглощения соединения **2.56** ( $0.5 \cdot 10^{-4}$  М в MeCN)

Для проведения дальнейшей функционализации кислоты **2.56** был получен ее активированный эфир **2.57**, который легко реагирует с аммиаком, первичными и вторичными аминами, а полученные амиды легко претерпевают гетеролитический разрыв по связи C-S в условиях ионизации электрораспылением (рис. 2.28).



**Рис. 2.28.** Синтез активированного эфира **2.57** и соответствующих амидов **2.58**

Сначала мы определили предел детекции соединения **2.57**, он составил 20.000.000 молекул (объем пробы - 2 мкл  $1.67 \cdot 10^{-11}$  М раствора) (рис. 2.29).

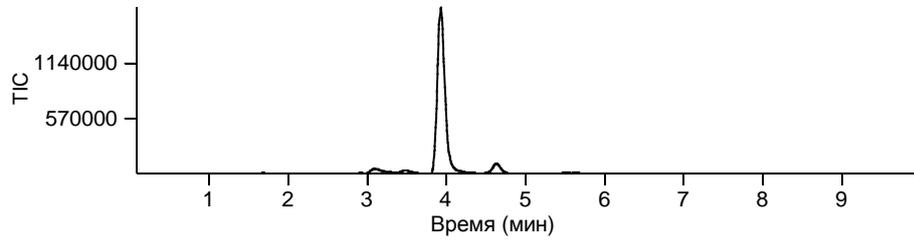


**Рис. 2.29** Предел детекции соединения **2.57**, определенный методом ВЭЖХ-МС (30 аттомоль в образце).

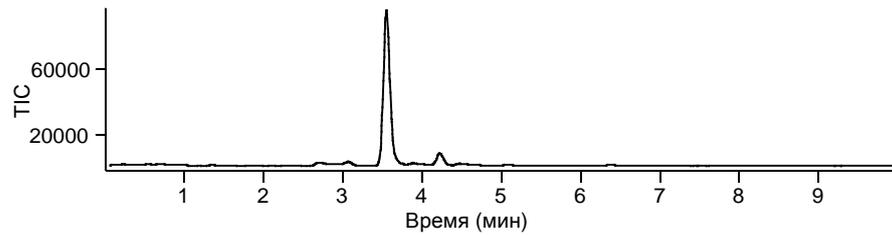
Полученную масс-спектрометрическую метку **2.57** мы предлагаем использовать для детекции низкомолекулярных и летучих аминов, поскольку эта проблема довольно актуальна для пищевой химии и химии окружающей среды. Несмотря на то, что разработаны различные методы детекции таких аминов [380-386], описываемый нами

подход отличается экспериментальной простотой и высокой чувствительностью. На рис. 2.30 представлены профили ВЭЖХ-МС индивидуальных дериватизированных аминов.

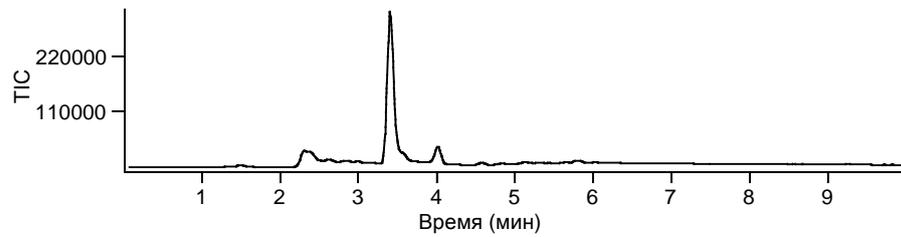
а)



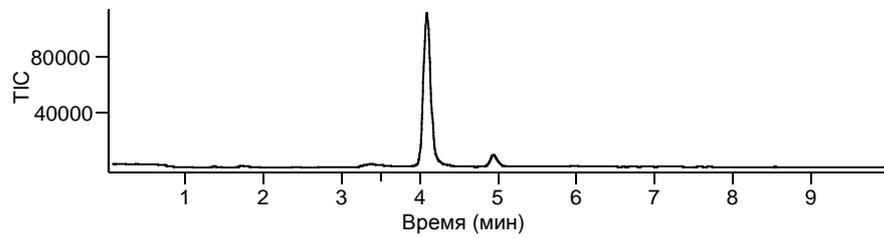
б)



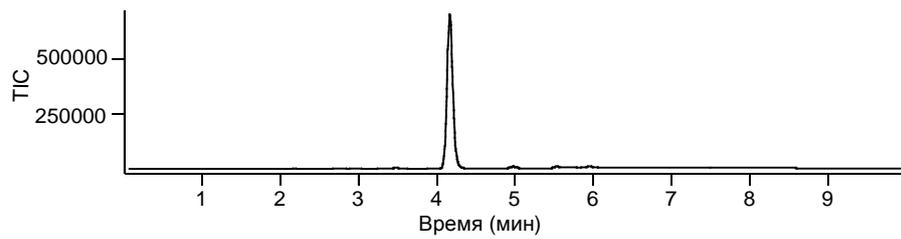
в)



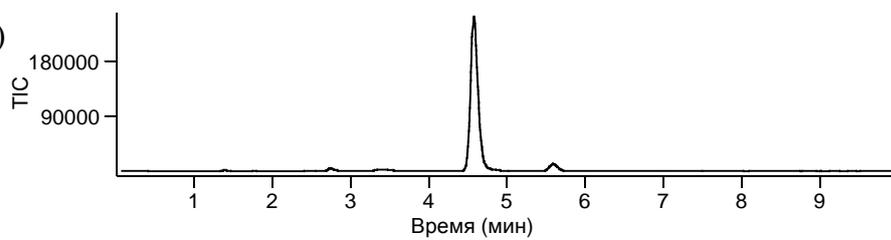
г)

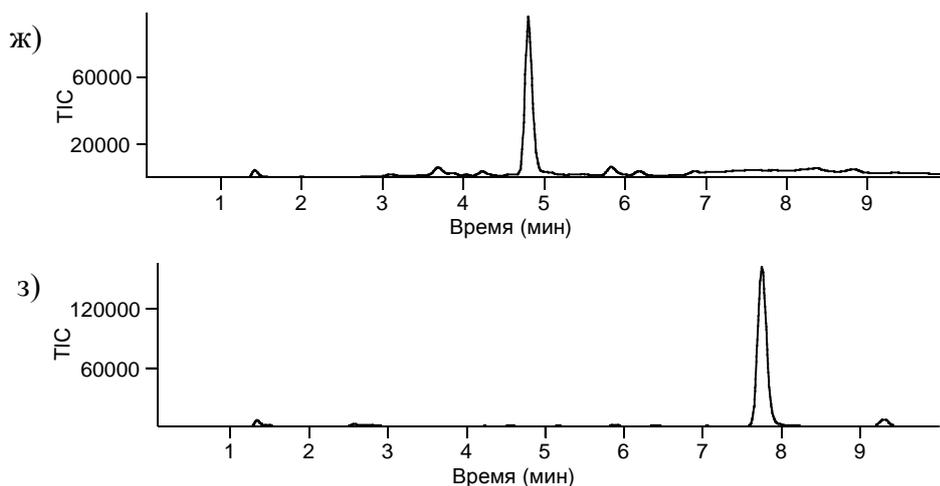


д)



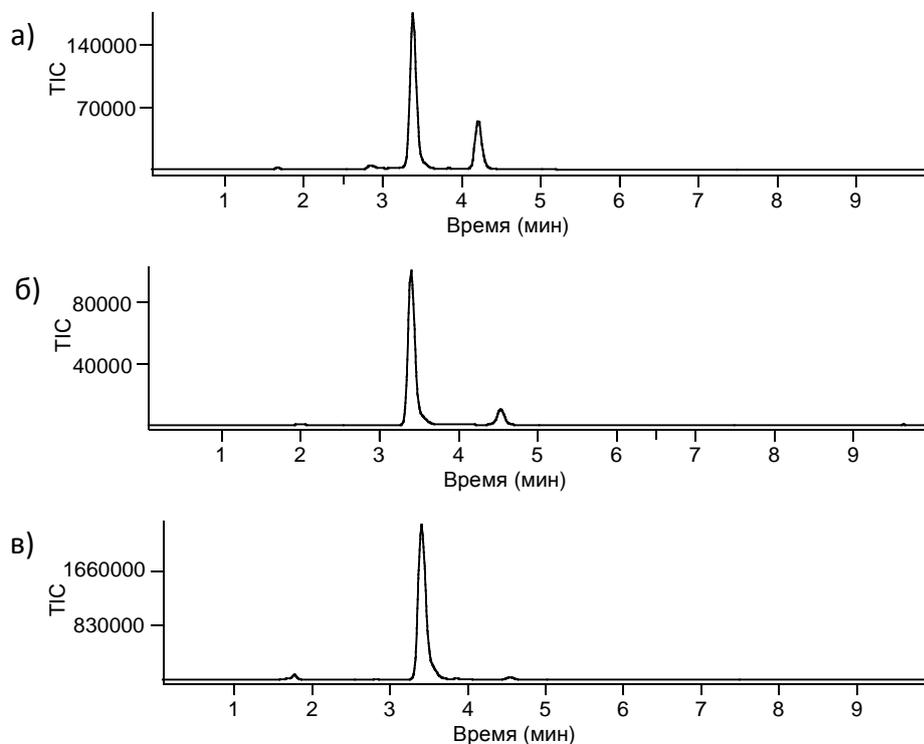
е)





**Рис. 2.30** Режим выбранного иона (SIM,  $m/z$  267) ВЭЖХ-МС амидов **2.58**, полученных действием на соединение **2.57** (а) избытков аммиака (б),  $\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$  (в), изопропиламина (г), бензиламина (д), пирролидина (е), *n*-пентиламина (ж) и *n*-дециламина (з) (по 4 пмоль амида в каждом образце).

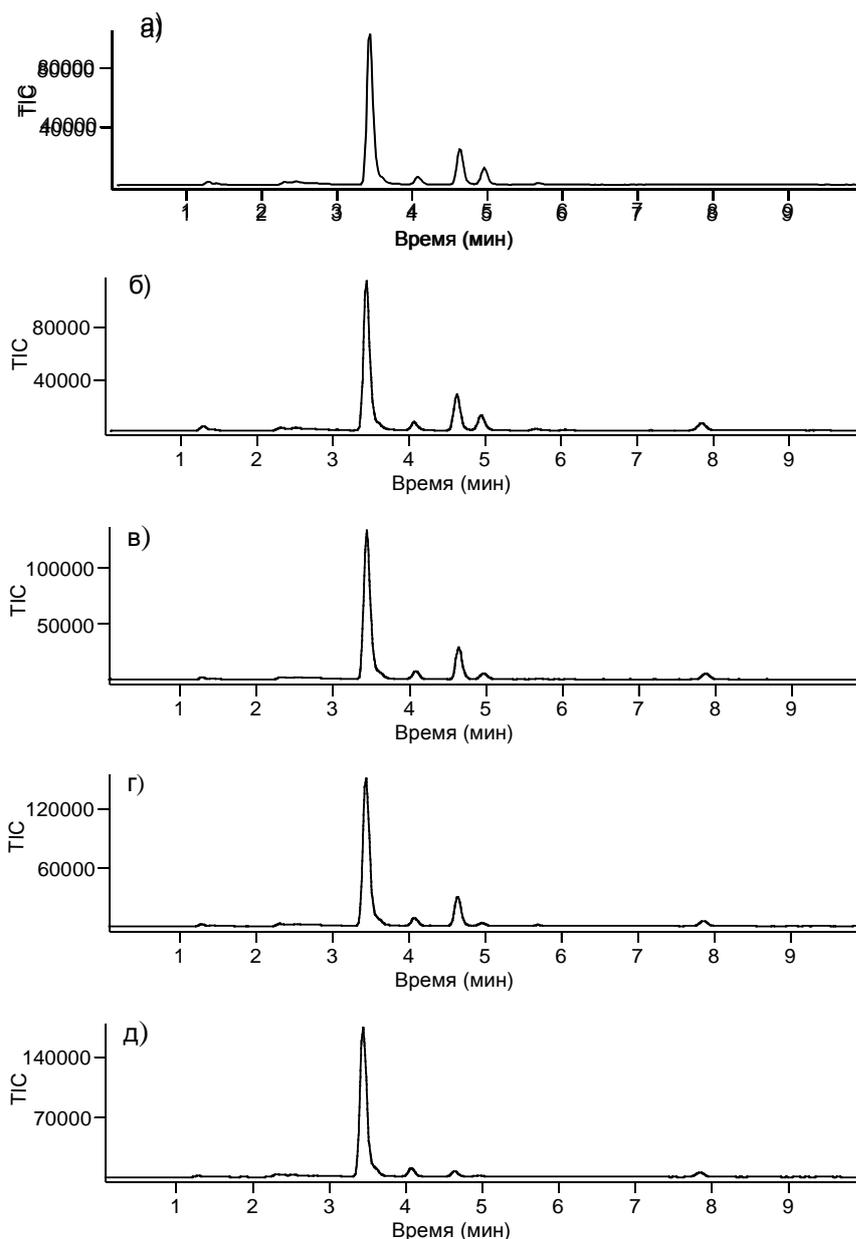
Также были протестированы смеси амидов в различных соотношениях (рис 2.31). Соотношение концентраций 3:1 и 10:1 четко коррелирует с соотношением площадей пиков хроматомасс-спектра. Но эта корреляция ухудшается при переходе к соотношению концентраций соединений 100:1, поэтому мы не рекомендуем при количественном анализе аминов предлагаемым методом использовать концентрацию внутреннего стандарта более чем на порядок отличающуюся от концентрации аналита.



**Рис. 2.31** Режим выбранного иона (SIM,  $m/z$  267) ВЭЖХ-МС амидов **2.58**,  $\text{R} = (\text{CH}_2)_4\text{OH}$  и  $\text{R} = n\text{-C}_3\text{H}_7$ , соотношение 3:1 (а);  $\text{R} = (\text{CH}_2)_4\text{OH}$  and  $\text{R} = n\text{-C}_4\text{H}_9$ , соотношение 10:1 (б), соотношение 100:1 (в).

Стоит отметить, что время удерживания амидов **2.58** коррелирует с липофильностью соответствующих аминов. Для гидрофильных аминов (аммиак, 4-аминобутанол) время удерживания гораздо меньше, чем для липофильных (*n*-дециламин).

Для количественной оценки содержания аминов в смеси мы предлагаем следующий подход: избыток масс-спектрометрической метки обрабатывается смесью аминов (в нашем случае - пирролидином с *n*-пентиламином), а затем оставшийся активированный эфир «гасится» 4-аминобутанолом, в качестве внутреннего стандарта используется амид **2.58**, полученный из *n*-дециламина.



**Рис. 2.32** Профиль ВЭЖХ-МС дериватизированной МС-меткой **2.57** ( $1.5 \cdot 10^{-6}$  М) смеси пирролидина и *n*-пентиламина. После дериватизации к реакционной смеси был добавлен 4-аминобутанол. Проба 2 мкл. Рассчитанные концентрации пирролидина и *n*-пентиламина соответственно:  $3 \cdot 10^{-7}$  М и  $2 \cdot 10^{-7}$  М (а, б);  $3 \cdot 10^{-7}$  М и  $1 \cdot 10^{-7}$  М (в);  $3 \cdot 10^{-7}$  М и  $5 \cdot 10^{-8}$  М (г);  $8 \cdot 10^{-8}$  М и  $2 \cdot 10^{-8}$  М (д); *n*-дециламид **2.58** ( $1 \cdot 10^{-7}$  М) был добавлен как внутренний стандарт в экспериментах (б)-(д).

На профиле ВЭЖХ-МС (рис. 2.32) видны пики производных **2.58** – 4-гидроксibuтиламида (3.4 мин), пирролидиламида (4.6 мин), *n*-пентиламида (4.9 мин) и *n*-дециламид (7.8 мин), последний, благодаря высокой липофильности, является удобным внутренним стандартом. Улучшая технологии пробоподготовки и удаления избытка масс-спектрометрической метки (например, используя специальные аминокосодержащие полимеры) можно улучшить возможности предлагаемого метода.

Итак, мы синтезировали представительный набор замещенных триарилциклопропенилиевых катионов, подробно изучили их взаимодействие с широким кругом различных нуклеофилов и показали, что *S*-связанный трифенилциклопропенилиевый катион может быть удобной масс-спектрометрической меткой, поскольку он детектируется как методами (МА)LDI-МС, так и при ионизации электрораспылением. На примере масс-спектрометрической метки **2.57** был предложен простой и удобный способ детекции летучих низкомолекулярных аминов методом ВЭЖХ-МС с чувствительностью определения аналита до 30 амоль.

В заключение этой раздела хотелось бы ещё раз сказать, что отщепляемые масс-спектрометрические метки представляют собой интересный инструмент для высокомультиплексных исследований, а высокая чувствительность современных масс-спектрометров позволяет использовать их даже в тех случаях, когда другие методы не пригодны. Основной проблемой дизайна масс-спектрометрических меток является, как правило, обратная зависимость между их химической стабильностью и региоселективностью разрыва определенных связей. Активное использование масс-спектрометрических методов в протеомике, геномике и метаболомике дает мощный толчок для развития химии масс-спектрометрических меток, что наглядно демонстрируется постоянным появлением в научной литературе новых структур таких меток.

## 2.2 Неотщепляемые масс-спектрометрические метки

Благодаря появлению методов с «мягкой» ионизацией, таких как ионизация электрораспылением (ИЭР), химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД) и масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI), значительно расширились границы масс-спектрометрического анализа различных классов соединений [387]. Однако и эти методы не лишены недостатков, главный из них - низкая эффективность 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 [92, 101, 104, 113, 116, 129]. Примеры использования такого подхода – ковалентное присоединение к анализируемой молекуле аммониевых [160, 163, 217] и фосфониевых [169, 172, 211] солей, замещенных триарилметильных производных [202, 201], катионов цианиновых красителей [249] и производных полициклического ароматического углеводорода пирена [226]. 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.

В этой связи перед нами стояла задача синтезировать и исследовать масс-спектрометрические свойства молекулы, содержащей, во-первых, перманентный заряд, во-вторых, имеющую молекулярную массу, не менее нескольких сот дальтон, а, в-третьих, легко реагирующую с определенной функциональной группой органических соединений в мягких условиях, с количественным выходом и с высокой скоростью. Этим свойствам удовлетворяет молекула гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия, именно её мы предлагаем в качестве удобной неотщепляемой масс-спектрометрической метки для детекции соединений, содержащих первичную аминогруппу.

### 2.2.1 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для дериватизации первичной аминогруппы низкомолекулярных биорегуляторов

Реакция нуклеофильного замещения метокси-группы, расположенной в пара-положении бензольного кольца трис(2,4,6-триметоксифенил)метильного катиона **2.60**, амино-группой первичных и вторичных аминов описана в работах [199, 388]. В работе [201] продемонстрировано её применение для дериватизации аминокислот и пептидов с последующим анализом методом MALDI-МС. Эти же авторы указали на возможное использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона **2.59** для модификации первичных аминов, однако данный подход так и не был развит в рамках их исследования. Хотя, на наш взгляд, взаимодействие этого соединения с аминами представляет гораздо больше интереса и перспектив для разработки метода химической модификации аналитов. В ходе реакций при комнатной температуре образуются тритил/акридиниевые катионы  $Q^+-R$  (рис. 2.33):

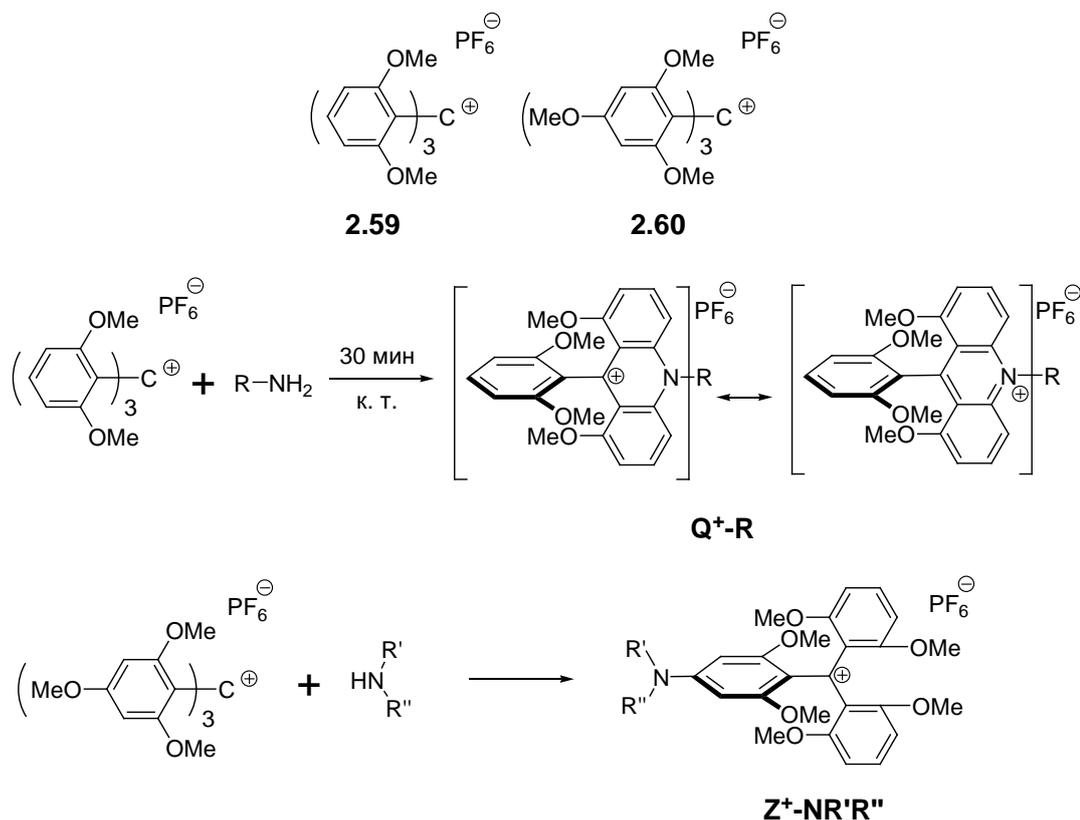
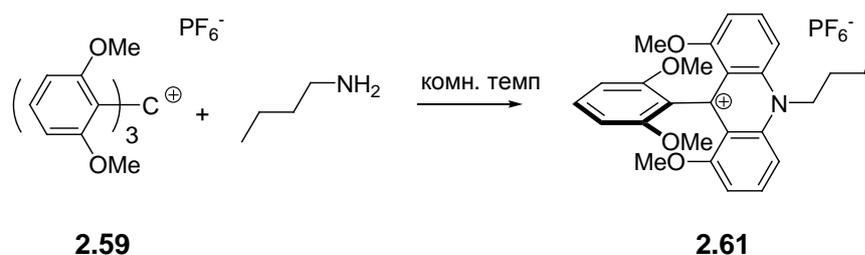


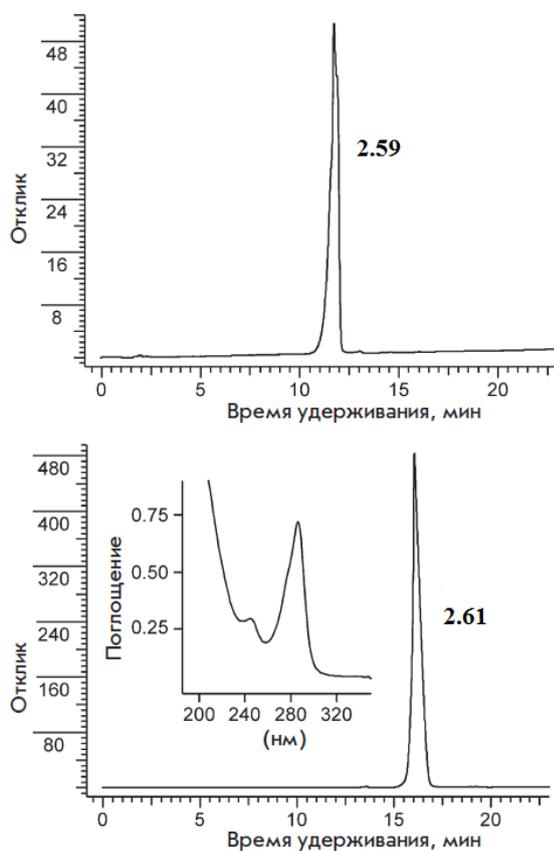
Рис. 2.33 Общая схема дериватизации аминов соединениями **2.59** и **2.60**

При продолжительном нагревании реакция способна проходить и глубже, с элиминированием следующих метоксильных групп, но при комнатной температуре она останавливается на первой стадии [198, 199]. В настоящей работе мы изучили возможность использования этой реакции для дериватизации соединений с первичной амино-группой с последующей регистрацией масс-спектров MALDI (LDI) продуктов их химических превращений. Как было отмечено выше, реакция катиона **2.59** с аминами

протекает при комнатной температуре в течение нескольких минут. В модельных условиях, в присутствии избытка амина, протекание превращения катиона **2.59** в катион **Q<sup>+</sup>** можно контролировать визуально по изменению цвета реакционной смеси от фиолетового к красному. Для дериватизации аминов в малых концентрациях, наоборот, используют избыток катиона **2.59**. Для определения оптимальных условий функционализации аминов нами была изучена реакция между катионом **2.59** и *n*-бутиламином.

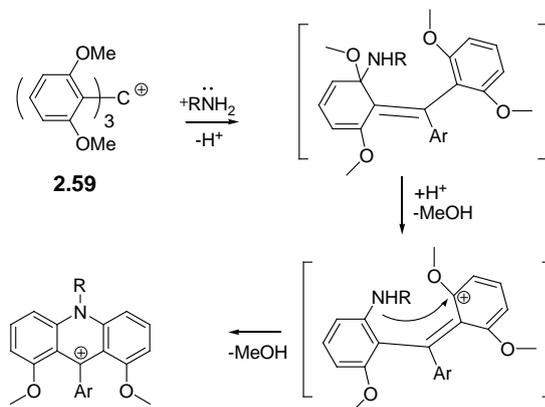


В избытке амина уже при комнатной температуре в течение 10 мин в ацетонитриле завершается полная конверсия исходного субстрата **2.59** в единственный продукт **2.61**. Полнота превращения легко контролируется обычной ОФ-ВЭЖХ, поскольку соединение **2.61** поглощает свет в УФ-диапазоне (рис. 2.34). Реакция не требует каких-либо специальных условий.



**Рис. 2.34** Профиль ОФ-ВЭЖХ исходного соединения **2.59** (верхний) и реакционной смеси с **2.59** с *n*-бутиламином (нижний); условия см. эксп. часть. На врезке – спектр поглощения вещества **2.61**

Структура аддукта **2.61** была подтверждена с помощью 1D и 2D ЯМР-спектроскопии с полным отнесением сигналов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Механизм образования вещества **2.61**, по-видимому, включает ипсо-атаку аминогруппы в орто-положение одного из арильных колец катиона **2.59** с последующим элиминированием метанола и повторным нуклеофильным замещением метокси-группы во втором кольце [389].



Конъюгат **2.61** легко детектируется как методом MALDI-МС (рис. 2.35а), так и LDI-МС (рис. 2.35б)

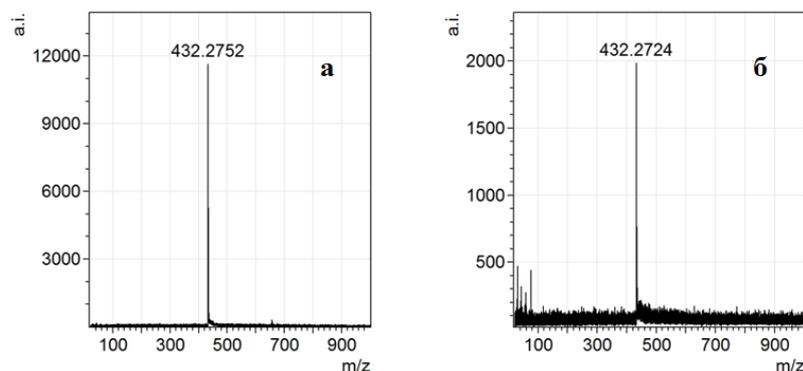
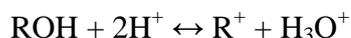


Рис. 2.35 Спектр конъюгата **2.61** зарегистрированный методом MALDI-МС (а), LDI-МС (б).

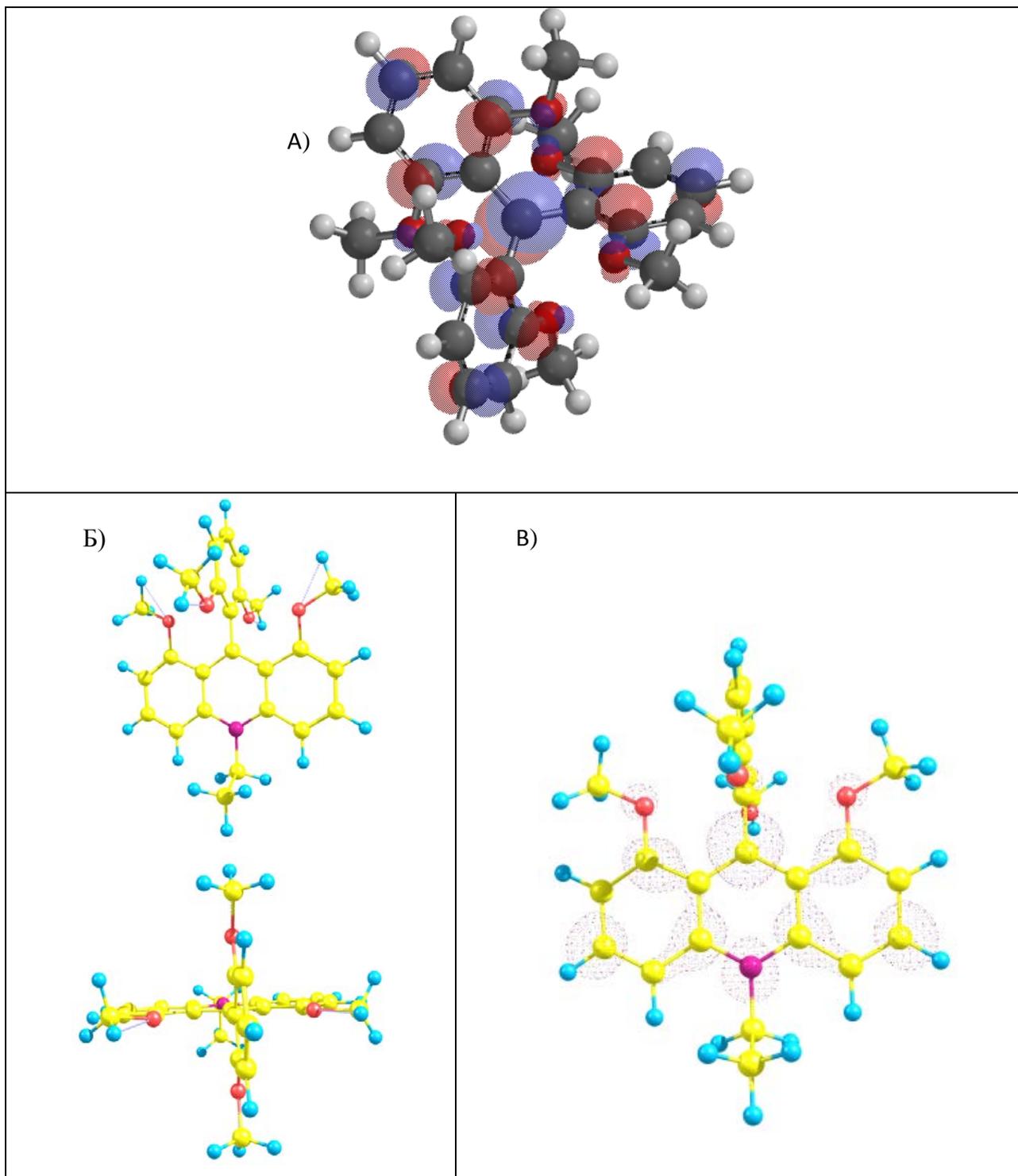
В сильнощелочной среде окрашенный катион **2.61** способен присоединять гидроксид-анион и переходить в бесцветный тританол. Для оценки стабильности карбокатионов принято использовать величину  $\text{pK}_{\text{R}^+}$ , физический смысл которой, по определению, это величина  $\text{pH}$ , при которой концентрации катионной (окрашенной) формы и неокрашенной равны [390–393]. Концентрации  $\text{R}^+$  (окрашенной формы) и  $\text{ROH}$  (неокрашенной) определяют, как правило, спектрофотометрически, а затем вычисляют величину  $\text{pK}_{\text{R}^+}$



$$\text{pK}_{\text{R}^+} = \text{H}_{\text{R}} + \lg([\text{R}^+]/[\text{ROH}])$$

$\text{H}_{\text{R}}$  – функция кислотности растворителя

Для соединения **2.61** экспериментальная оценка дает значение  $pK_{R^+} \approx 18$ , что свидетельствует об исключительно высокой стабильности катиона: даже в слабощелочных условиях доля катионной формы составляет практически 100%.

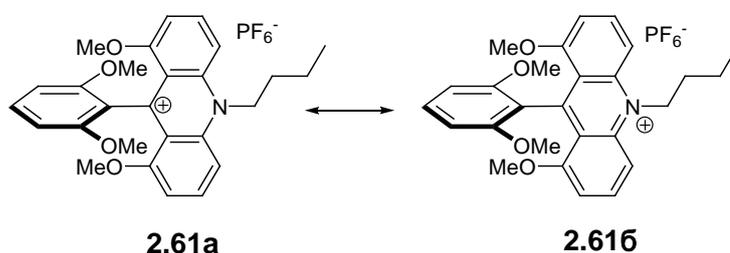


**Рис. 2.36** Рассчитанные методом PM3<sup>1</sup> А) конфигурация НСМО–орбитали исходного гексаметокситрильного карбокатиона; Б) 3-D структура катиона Q<sup>+</sup>-Et; атомы углерода показаны желтым цветом, атомы кислорода – красным, азота – розовым, водорода – бирюзовым; В) конфигурация НСМО–орбитали катиона Q<sup>+</sup>-Et

<sup>1</sup> Автор выражает благодарность Е.Е. Быкову за помощь в проведении расчетов.

Как показывает квантово-химический расчет полуэмпирическим методом PM3, для катиона **2.59** характерна структура пропеллерного типа (рис. 2.36 А). На примере катиона  $Q^+$ -Et рассчитана геометрическая конфигурация, которая характеризуется высокой симметрией и ярко выраженным выведением диметоксифенильной группы в плоскость, ортогональную акридиновому фрагменту (рис. 2.36 Б).

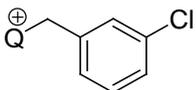
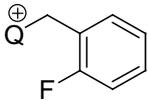
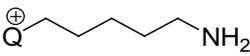
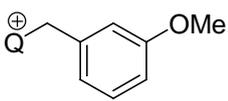
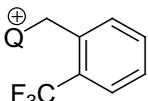
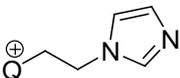
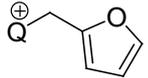
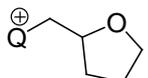
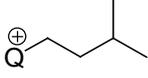
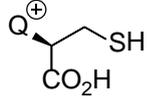
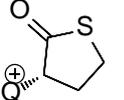
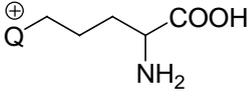
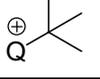
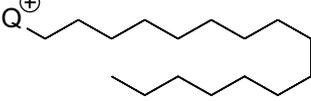
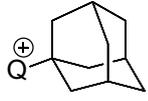
Также была проведена оценка формальных зарядов: они составили 0.324 на С-атоме и 0.300 на N-атоме центрального кольца акридинового фрагмента. С этим распределением зарядов совпадает и рассчитанная плотность НСМО орбитали на тех же атомах (рис. 2.36 В). Таким образом, локализация положительного заряда выше на центральном атоме углерода, и резонансная структура **2.61a** более соответствует строению веществ типа  $Q^+$ -R.

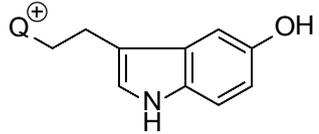
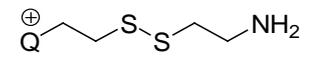
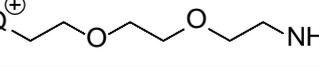
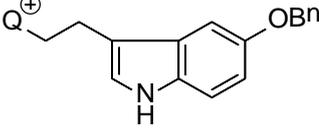
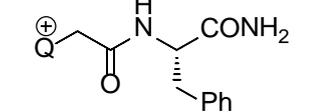
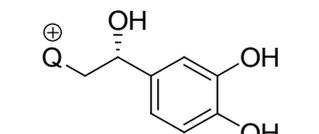
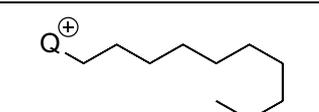
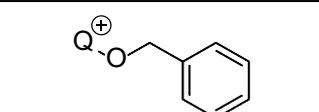
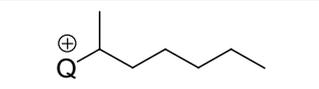
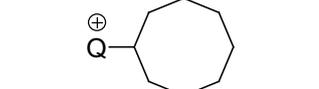
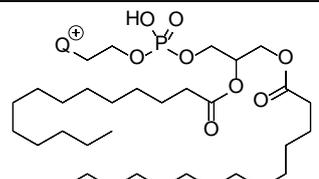
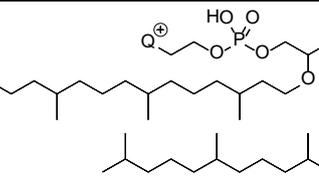


Для установления границ применимости данного метода были проведены эксперименты с различными первичными аминами (табл. 2.3): гидрофильными и гидрофобными, содержащими гетероциклический фрагмент, стерически затрудненными, ароматическими и биологически-активными аминами.

**Таблица 2.3** Изученные аналиты и продукты их дериватизации, массовые числа (Да) и относительные интенсивности пиков, соответствующих продуктов дериватизации

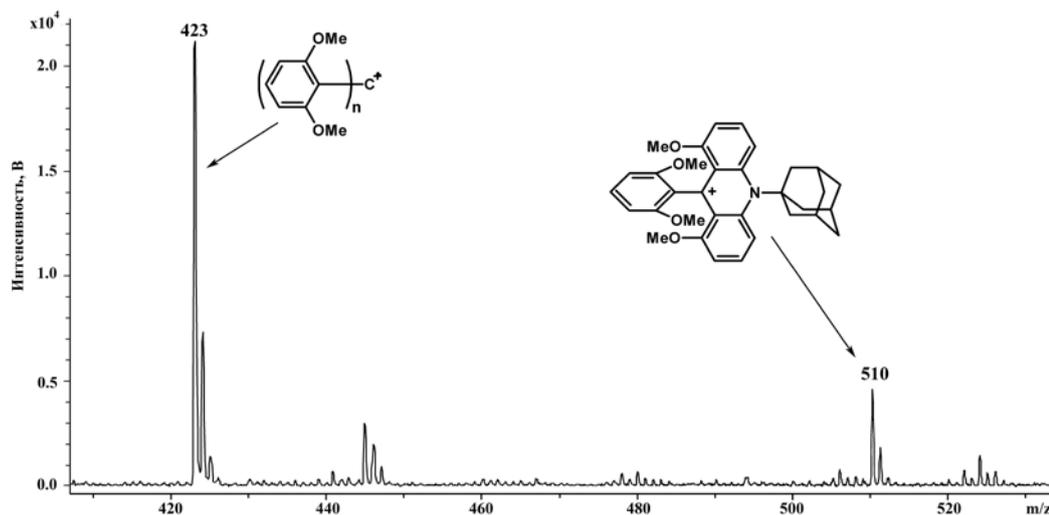
№ образовавшегося катиона	Амин	Продукт дериватизации, $Q^+$ -R	$m/z$ (RA, %)
<b>2.61</b>	<i>n</i> -бутиламин		432 (100)
<b>2.62</b>	<i>n</i> -пропиламин		418 (100)
<b>2.63</b>	2-фенилэтиламин		480 (100)
<b>2.64</b>	3-фенилпропиламин		494 (100)
<b>2.65</b>	4-фенилбутиламин		508 (100)
<b>2.66</b>	2-диметиламиноэтиламин		447 (100)

2.67	3-хлорбензиламин		500 (100)
2.68	2-фторбензиламин		484 (100)
2.69	1,5-пентандиамин*		461 (100)
2.70	анилин	$\text{Q}^{\oplus}\text{-Ph}$	452 (100)
2.71	3-метоксибензиламин		496 (100)
2.72	2-(трифторметил)бензиламин		534 (100)
2.73	1-(2-аминоэтил)-имидазол		470 (100)
2.74	фурфуриламин		456 (100)
2.75	тетрагидрофурфуриламин		460 (100)
2.76	изоамиламин		446 (100)
2.77	метиловый эфир цистеина		508 (68)
2.78	гомоцистеинтиолактон		476 (29)
2.79	лизин		491 (21)
2.80	<i>трет</i> -бутиламин		432 (18)
2.81	<i>n</i> -гексадециламин		600 (100)
2.82	1-адамантиламин		510 (100)

2.83	серотонин		535 (100)
2.84	цистамин*		511 (100)
2.85	1,8-диамино-3,6-диоксаоктан*		507 (100)
2.86	<i>O</i> -бензилсеротонин		625 (100)
2.87	амид глицилфениланина		580 (100)
2.89	норадреналин		528 (100)
2.90	дециламин		516 (100)
2.91	<i>O</i> -бензилгидроксиламин		482 (59)
2.92	2-аминогептан		474 (100)
2.93	циклооктиламин		486 (100)
2.94	димиристоилфосфатидил-этанолламин (ДМФЭ)		994 (100)
2.95	дифетанилфосфатидил-этанолламин (ДФФЭ)		1162 (88)

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

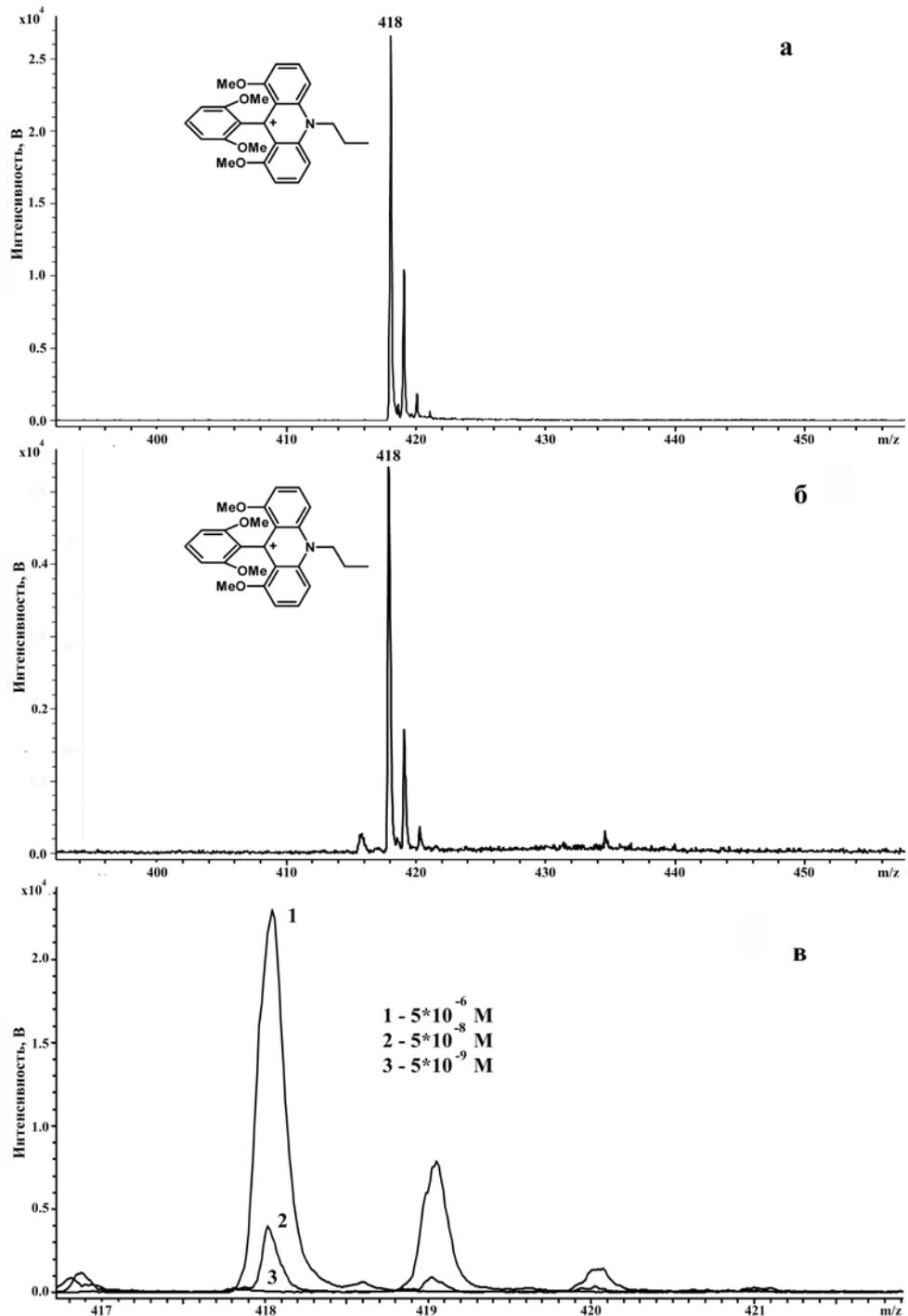
Во всех случаях масс-спектры (МА)LDI продуктов дериватизации содержали интенсивные пики соответствующих катионов  $Q^+-R$ . Амины, содержащие аминогруппу при первичном атоме углерода, практически количественно превращаются в конечные продукты. Например, при взаимодействии катиона **2.59** с двукратным мольным избытком *n*-пропиламина или *n*-бутиламина уже через 30 мин в масс-спектрах обнаруживаются только ионы продуктов дериватизации  $Q^+-R$ , в то время как пик исходного катиона **2.59** полностью исчезает. 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 **2.59** с избытком 1-адамантиламина образуется аддукт **2.82** (рис. 2.37,  $m/z$  510), однако интенсивность соответствующего пика иона существенно меньше, чем для исходного катиона **2.59** (рис. 2.37,  $m/z$  423), что однозначно свидетельствует о неполной конверсии дериватирующего агента **2.59**.



**Рис. 2.37** Масс-спектр MALDI реакционной смеси, содержащей катион **2.59** и двукратное мольное количество 1-адамантиламина через 30 мин после начала реакции.

Также необходимо отметить, что масс-спектры продуктов дериватизации бис-аминов **2.69**, **2.84**, **2.85** и лизина **2.79** содержали пики ионов, соответствующих продуктам реакции только по одной функциональной амино-группе, независимо от того, проводилась ли реакция с избытком амина или катиона **2.59**. Наблюдаемый эффект, видимо, связан с малой вероятностью регистрации двух- и более зарядных ионов в условиях MALDI-МС. В случае лизина дериватизация, предположительно, с большей вероятностью проходит по амино-группе в боковой цепи, однако дополнительных исследований по определению состава продуктов дериватизации этого соединения не проводилось.

Другой важной особенностью предлагаемого подхода является не только потенциальное выведение сигнала аналита из области матричных шумов в результате введения в низкомолекулярное соединение фрагмента с достаточно большим инкрементом массы (359 Да), но и увеличение эффективности десорбции/ионизации изучаемых соединений в результате образования производного с фиксированным зарядом. Установление предела обнаружения (без концентрирования и пробоподготовки) реакционноспособных аминов было выполнено на примере взаимодействия катиона **2.59** с *n*-пропиламинном (продукт дериватизации **2.62**). При больших концентрациях *n*-пропиламин находится в избытке по отношению к агенту для дериватизации, и в масс-спектре наблюдается исключительно ион продукта дериватизации (**2.62**) (рис. 2.38а).



**Рис. 2.38** Масс-спектры MALDI (а) и LDI (б) продукта дериватизации соединения **2.62** (а), сравнение интенсивности соответствующего пика иона при различных концентрациях растворов продуктов дериватизации этого соединения в условиях MALDI (в).

Оказалось, что указанный ион достоверно ( $S/N > 3$ ) обнаруживается до концентрации 50 нМ (рис. 2.38б); при этом объем анализируемой пробы составляет 0.5 мкл, т.е. предел обнаружения вещества **2.62** на мишени составляет 25 фмоль. Поскольку концентрирование аминов экстракционными методами является достаточно простой задачей, очевидно, что в этом случае обнаруживаемые концентрации аминов можно уменьшить еще на несколько порядков.

Поскольку продукты дериватизации поглощают УФ-излучение в области длины волны используемого для ионизации лазера (337 нм), возможна регистрация их масс-спектров в режиме лазерной десорбции/ионизации при отсутствии матрицы (рис. 2.38в). Это свойство дополнительно расширяет диапазон возможностей метода.

Мы нашли, что предлагаемый способ дериватизации пригоден также и для *O*-замещенных гидроксиламинов. Взаимодействием соли **2.59** с *O*-бензилгидроксиламином получен предполагаемый продукт дериватизации  $Q^+ \text{-OCH}_2\text{Ph}$  (**2.91**) (рис. 2.39,  $m/z$  482). При этом, однако, зарегистрирован и катион  $Q^+ \text{-H}$  ( $m/z$  376), образование которого, видимо, объясняется легкостью разрыва связи N–O.

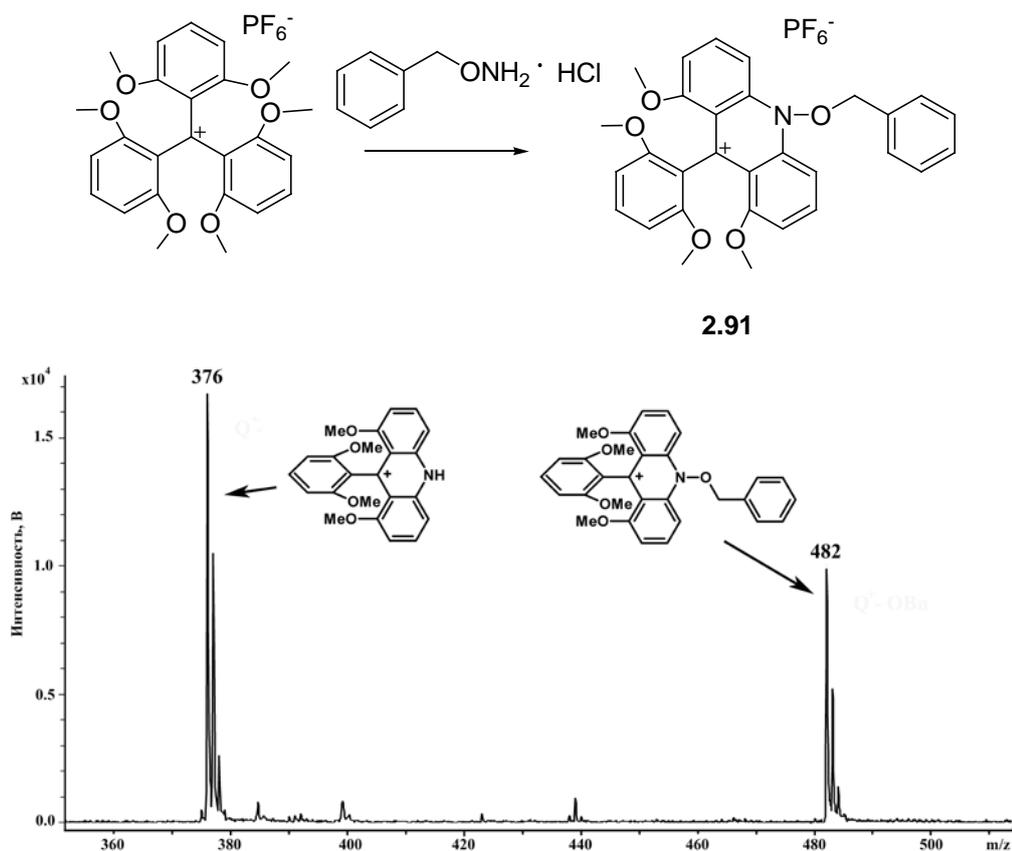
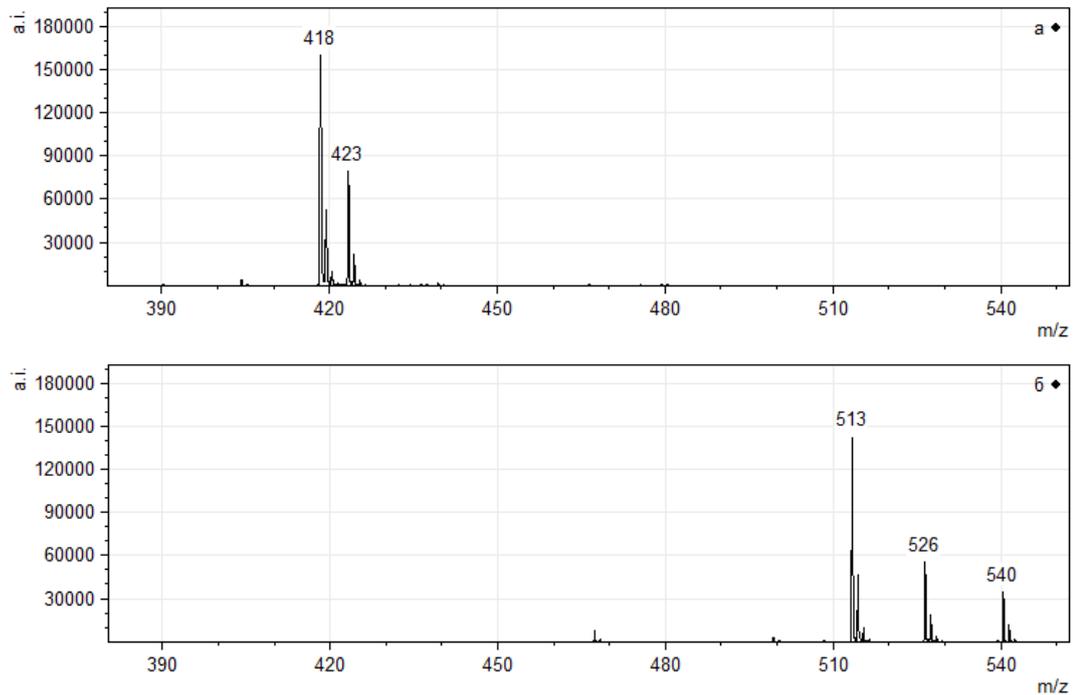


Рис. 2.39 Масс-спектр MALDI продукта дериватизации *O*-бензилгидроксиламина **2.91**.

Также интересной является идея одновременного использования меток **2.59** и **2.60** для дифференциации изомерных вторичных и первичных аминов. Как было сказано в начале настоящей главы, трис(2,4,6-триметоксифенил)метиловый катион **2.60** реагирует и с первичными и с вторичными аминами, а трис(2,6-диметоксифенил)метиловый **2.59** – только с первичными (рис. 2.33). Растворы, содержащие диметиламин и *n*-пропиламин, были обработаны избытком реагентов **2.59** и **2.60**. Как видно на рисунке 2.40а в случае дериватизации реагентом **2.59** в масс-спектре видны пики только модифицированного *n*-пропиламина ( $m/z$  418) и избытка реагента **2.59** ( $m/z$  423), а в случае использования

реагента **2.60** видим (рис. 2.40 б) как пики модифицированных *n*-пропиламина ( $m/z$  540), диметиламина ( $m/z$  526) так и избыток катиона **2.60** ( $m/z$  513).

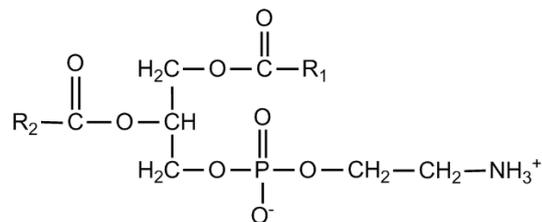


**Рис. 2.40** Спектры MALDI-МС реакционной смеси а) избытка реагента **2.59** с раствором диметиламина и *n*-пропиламина, (б) избытка реагента **2.60** с раствором диметиламина и *n*-пропиламина (матрица – синапиновая кислота).

### 2.2.2 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для дериватизации аминоксодержащих фосфолипидов

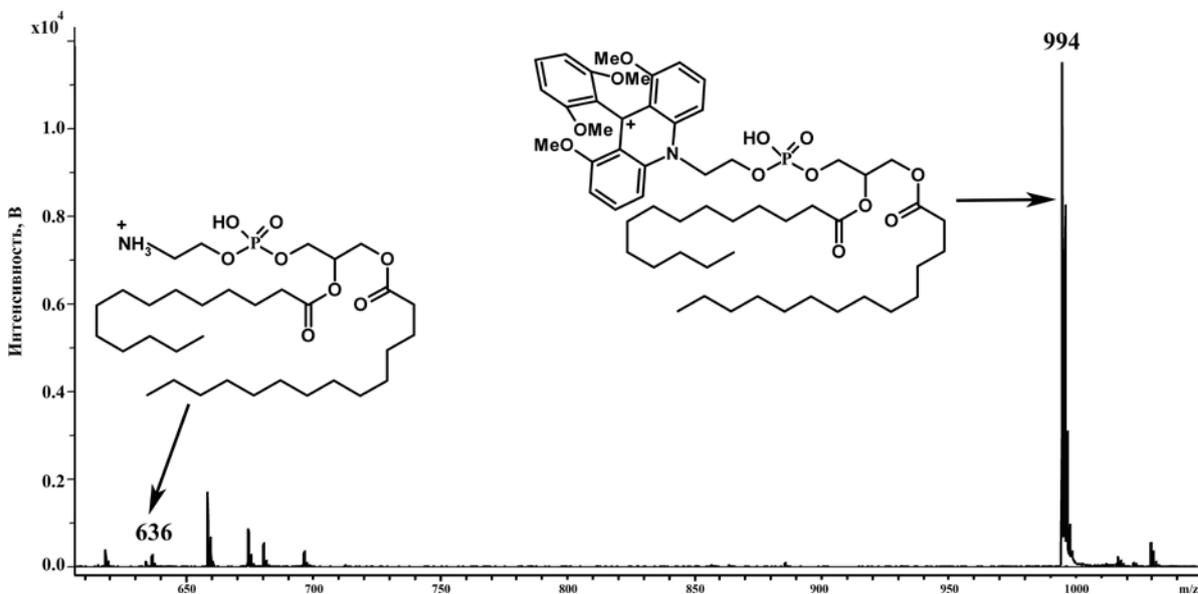
Фосфолипидами называют сложные липиды, содержащие в своем составе помимо фрагмента глицерина и жирных кислот, также остаток фосфорной кислоты и соединенную с ним добавочную группу (этаноламин, холин, серин, инозит и др.). Фосфолипиды служат важнейшим компонентом клеточных мембран и отвечают за их физические свойства (пластичность), а также участвуют в транспорте других липидов, жирных кислот и холестерина [393].

В рамках наших исследований особый интерес представляли фосфатидилэтаноламины, содержащие свободную аминогруппу.



Вследствие своей амфифильной природы данный класс биомолекул в водной среде, в отличие от органических растворителей, образует липидный бислой, что затрудняет их

дериватизацию в описанных выше условиях. Однако было показано, что гексафторфосфат трис(2,6-диметоксифенил)метилия растворяется в органических растворителях, поэтому была подобрана система таких растворителей ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 4:1$ ) для дериватизации фосфатидилэтаноламинов (табл. 2.3). Образующиеся продукты дериватизации **Q<sup>+</sup>-R 2.94** и **2.95** легко обнаруживаются в таких концентрациях, при которых сигнал исходного немодифицированного вещества в MALDI масс-спектре не виден вовсе (рис. 2.41).



**Рис. 2.41** Масс-спектр MALDI эквимольной (1 мМ) смеси соединения димиристоил-фосфатидилэтаноламина (ДМФЭ) и продукта его дериватизации **2.94**.

### 2.2.3 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для дериватизации аминогликозидных антибиотиков

Аминогликозиды представляют собой класс бактерицидных антибиотиков (преимущественно активных в отношении аэробной грамотрицательной микрофлоры), высокоэффективных при большинстве тяжелых инфекций (туберкулез, эндокардит, сепсис) [394]. Действие аминогликозидов не зависит от фазы размножения микроорганизма, они необратимо связываются с белками 30S-субъединицы бактериальных рибосом, нарушая тем самым синтез белка в них. Однако, необходимость аэробных условий делает их применение менее эффективным в плохо снабжаемых кровью и омертвевших тканях. Еще одним фактором, влияющим на бактерицидную активность аминогликозидов, оказывается pH среды – они менее эффективны в кислой и нейтральной средах по сравнению со слабощелочной. Но главным недостатком этой группы лекарств является их высокая ото- и нефротоксичность [395, 396] по сравнению с другими антибиотиками, что создает необходимость постоянного контроля их содержания не только в биологических жидкостях, но и в продуктах питания животного происхождения. За несколько десятилетий использования этих антибиотиков в клинической медицине

было разработано большое число лабораторных методов детекции аминогликозидов (с использованием ГХ-МС, ВЭЖХ, в том числе с дериватизацией, ИФА, капиллярного электрофореза и т.п.), и совсем недавно вышло два достаточно подробных обзора по этой тематике [397, 398]. Большое число публикаций в последние годы [399–411] свидетельствует об актуальности проблемы и необходимости поиска удобных, простых и экспрессных процедур их анализа, поскольку большинство существующих оказываются либо трудоемкими и долгими, либо предполагают использование дорогостоящих реагентов.

Молекулы аминогликозидных антибиотиков, как правило, содержат несколько аминогрупп (рис. 2.42). Помимо аминогрупп, непосредственно связанных с гетероциклом или алициклом, молекулы содержат аминогруппы, связанные с первичным атомом углерода (выделены красным цветом). Другой особенностью аминогликозидов является прозрачность их растворов в УФ-диапазоне, поскольку в этих молекулах отсутствуют сопряженные связи или ароматические фрагменты. Поэтому невозможен их прямой анализ с помощью ВЭЖХ с УФ-детектором. Обилие в молекуле гидроксильных групп и аминогрупп, способных образовывать водородные связи, затрудняет высвобождение индивидуальных молекул, что сильно снижает эффективность ионизации аминогликозидов в масс-спектрометрии, например, по сравнению с пептидами близкой массы. Кроме того, обнаружение аминогликозидов в MALDI масс-спектрометрии может осложняться попаданием сигналов вещества в область «шумов» матрицы.

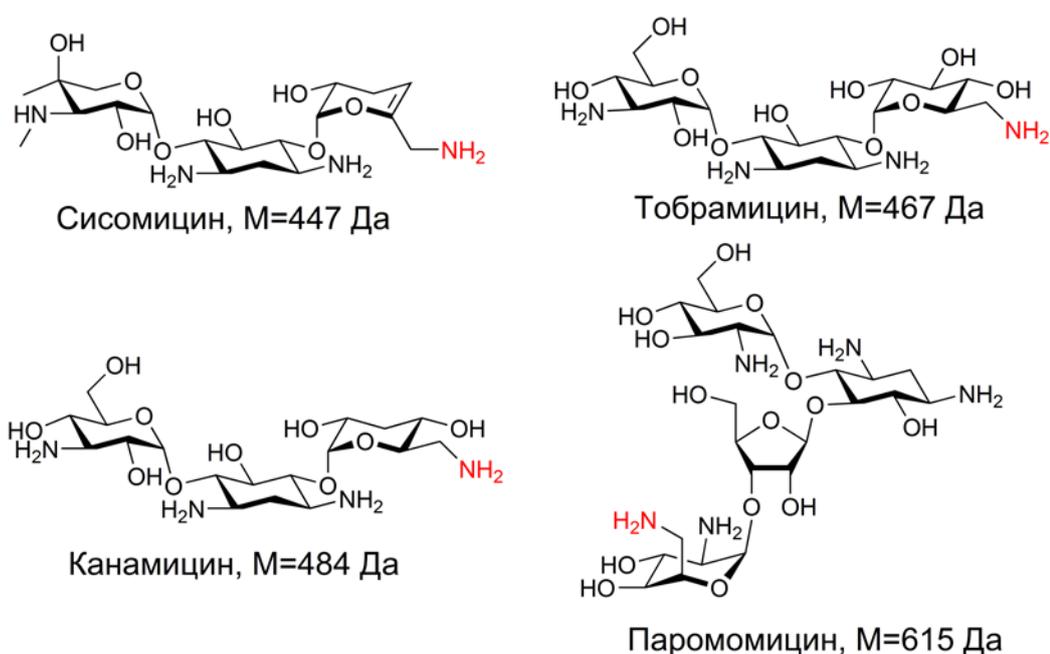
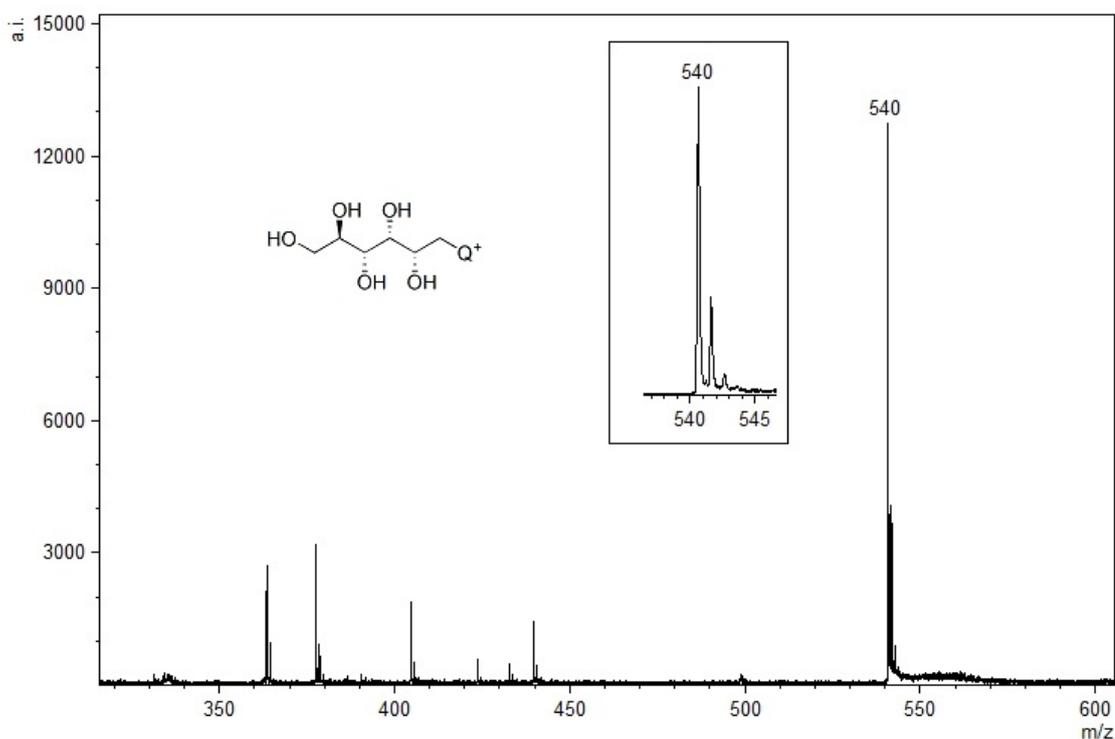


Рис. 2.42 Примеры структур аминогликозидных антибиотиков.

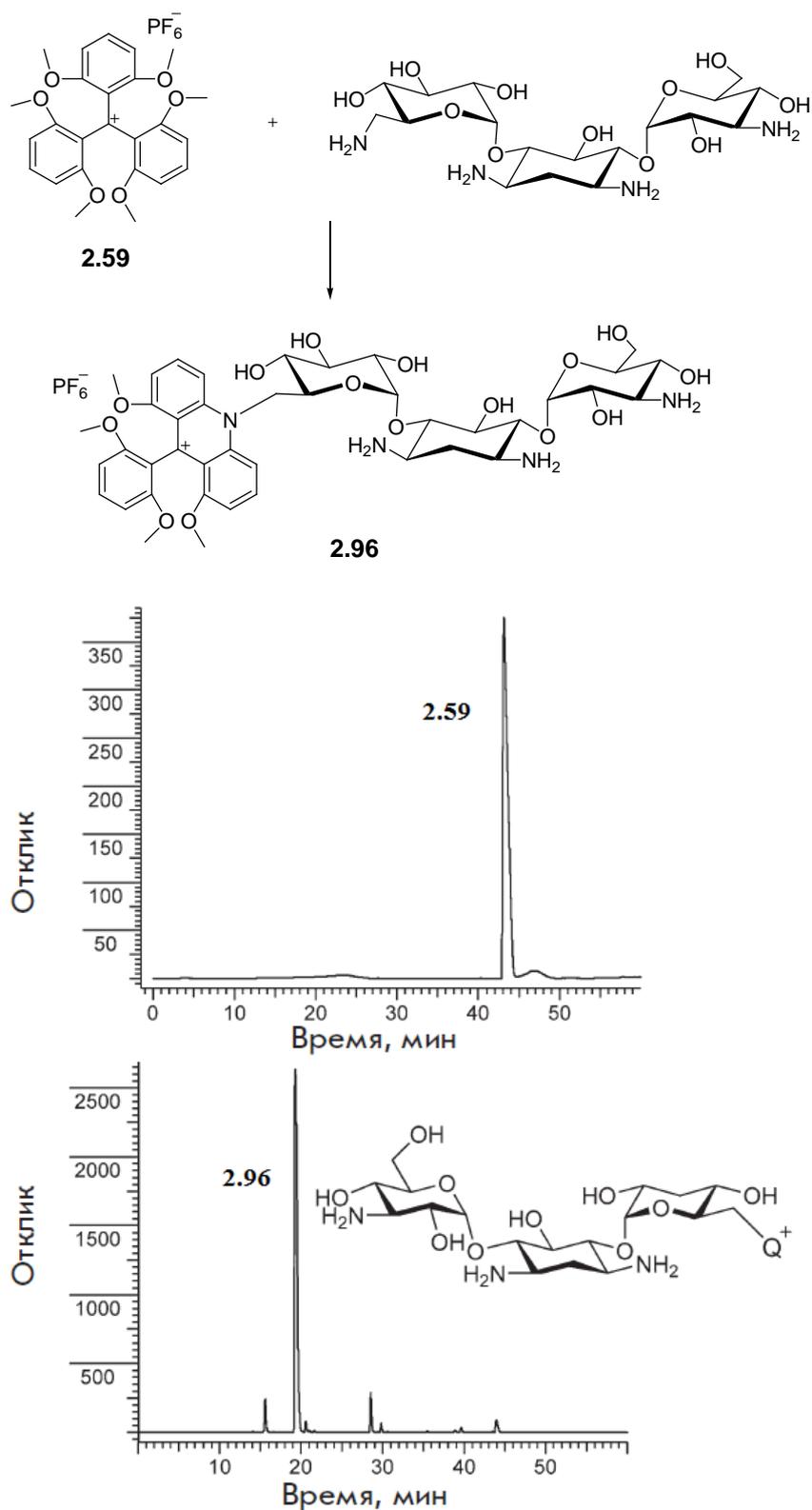
Здесь представляло интерес выяснить: можно ли применить описанный выше подход с дериватизацией трис(2,6-диметоксифенил)метильным катионом **2.59** для определения данного класса лекарственных препаратов.

Перед тем, как перейти непосредственно к аминогликозидным антибиотикам, мы решили поставить модельный эксперимент с простейшим аминоуглеводом – аминоглюцитолом. Аминоглюцитол в свободном виде невозможно определить методом масс-спектрометрии MALDI из-за небольшой молекулярной массы (181 Да) и затрудненной ионизуемости молекулы. Путём контроля времени исчезновения пятна исходного аминспирта при действии на него избытка дериватирующего агента методом ТСХ было установлено, что реакция проходит за 30 мин при комнатной температуре, и в спектре MALDI-МС виден четкий сигнал, соответствующий ожидаемой массе конъюгата (рис. 2.43).



**Рис. 2.43** Масс-спектр MALDI конъюгата соединения **2.59** с аминоглюцитолом (матрица – синапиновая кислота)

Для исследования возможности аналогичной дериватизации аминогликозидных антибиотиков нами были выбраны следующие препараты: канамицин, сисомин, паромомицин, тобрамицин (рис. 2.42). Поскольку коммерчески доступный препарат канамицина выпускается в форме сульфата канамицина, то образец был растворен в карбонатном буфере (pH 9.55). Также, как и в случае с *n*-бутиламином, реакция идет практически с полной конверсией (рис. 2.44).

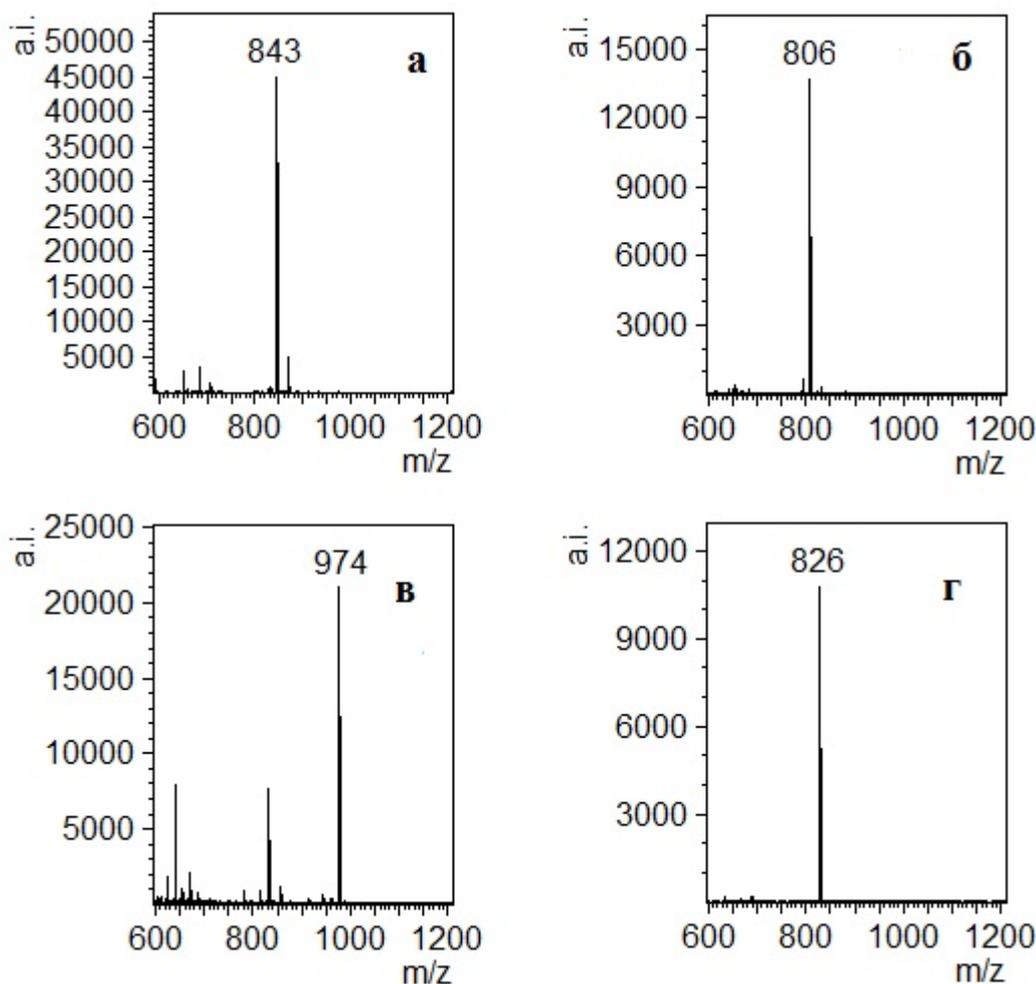


**Рис. 2.44** Профиль ВЭЖХ соединения **2.59** (верхний) и конъюгата **2.96** (**2.59** с канамицином) (нижний).

Особенностью строения исследуемых аминогликозидов, как уже было отмечено выше, является наличие нескольких аминогрупп, и модификация может проходить по любой из них. Однако, как показали наши эксперименты, реакция протекает гладко и дает один основной продукт (рис. 2.44). Последний был выделен препаративно методом ОФ-

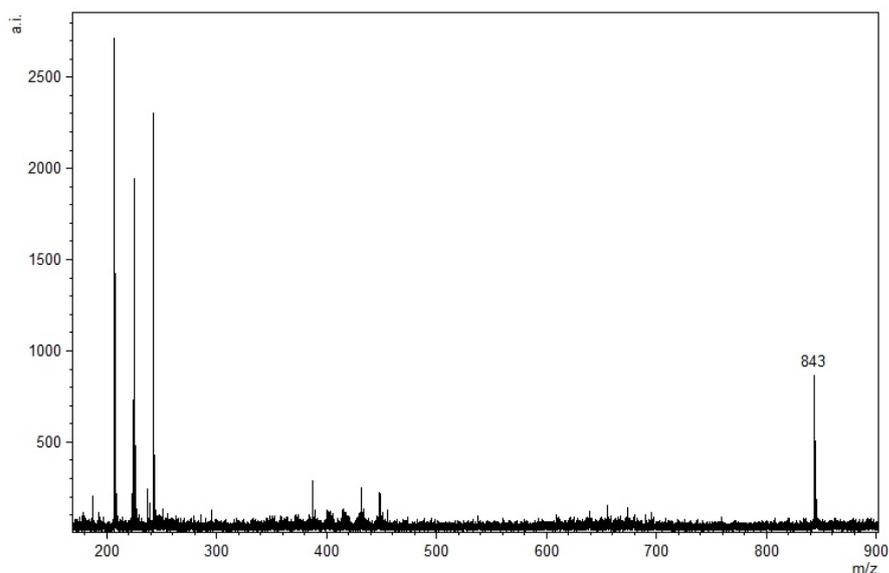
ВЭЖХ. Анализ двумерных 2D ЯМР-спектров соединения **2.96** показал, что дериватизация проходит селективно по аминогруппе первичного атома углерода (см. эксп. часть). По-видимому, это связано с ее более высокой стерической доступностью по сравнению с аминогруппами, непосредственно связанными с атомами углерода шестичленных циклов и экранированными соседними гидроксильными группами.

Для всех исследуемых соединений были получены спектры MALDI-МС с четким сигналом монодериватизированных соединений (рис. 2.45)



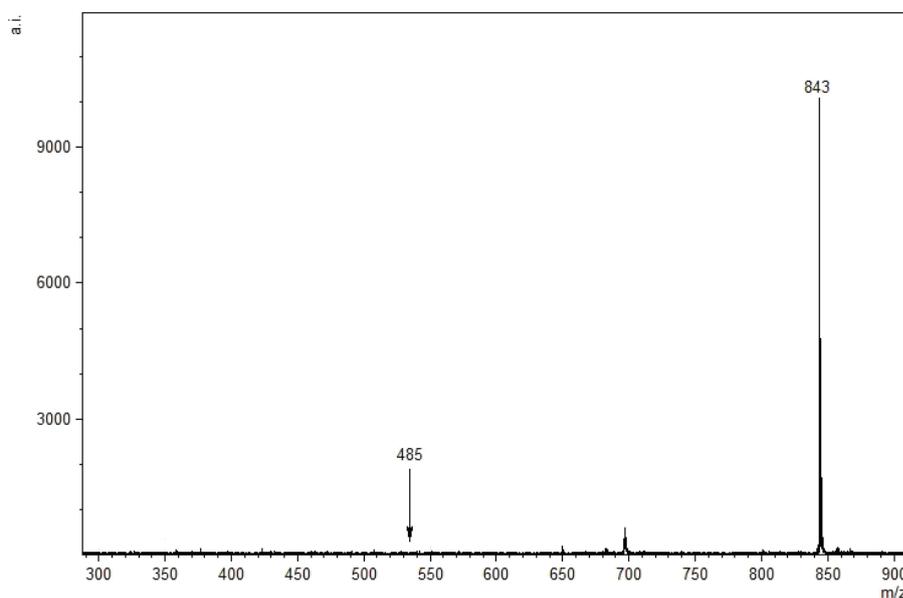
**Рис. 2.45** Спектры MALDI-МС дериватизированных антибиотиков (матрица – 2,4,6-тригидроксиацетофенон), а) канамицин- $Q^+$ , б) сисомицин- $Q^+$ , в) паромомицин- $Q^+$ , г) тобрамицин- $Q^+$ . Концентрация каждого конъюгата 10 мМ.

Продукт дериватизации легко детектируется масс-спектрометрически: при нанесении в ячейку мишени масс-спектрометра  $2 \times 10^{-12}$  моль конъюгата **2.96** в спектре MALDI-МС (рис. 2.46) 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 бóльших значений, что исключает перекрытие с сигналами матрицы.



**Рис. 2.46** Пик в масс-спектре конъюгата **2.96** при нанесении  $2 \times 10^{-12}$  моль вещества в ячейку мишени для масс-спектрометра (матрица – синапиновая кислота).

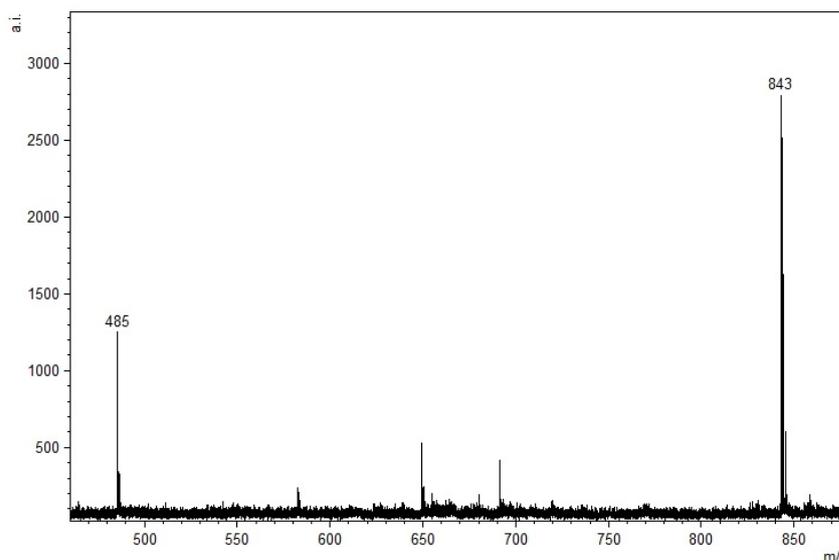
Чтобы ответить на вопрос, как дериватизация влияет на чувствительность обнаружения канамицина в МС-MALDI, был проведен эксперимент по совместной детекции канамицина и продукта его дериватизации. На рисунке 2.47 представлен спектр MALDI-МС эквимольной смеси немодифицированного канамицина и соединения **2.96**.



**Рис. 2.47** Спектр MALDI-МС эквимольной смеси соединения **2.96** ( $m/z$  843 (s/n 301.3) и немодифицированного канамицина ( $m/z$  485 (s/n 1.8) [M-H<sup>+</sup>]) (матрица – синапиновая кислота)

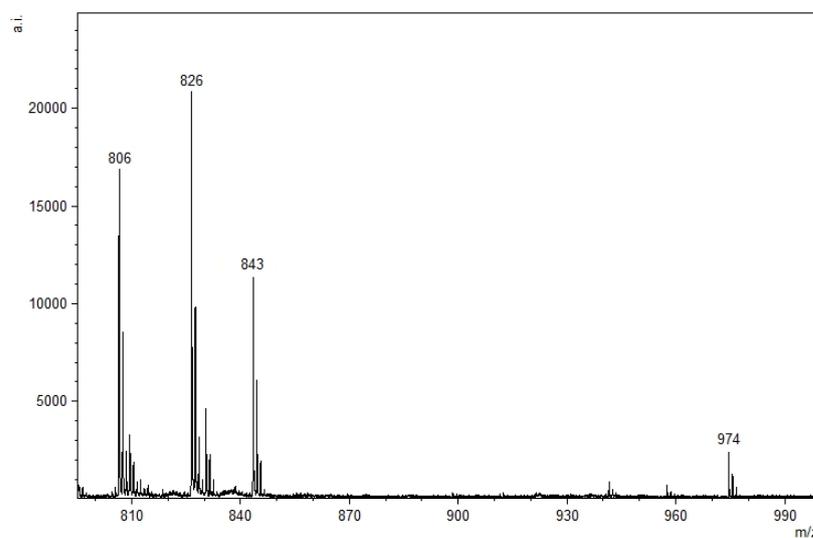
Интенсивность пика тритил/акридиниевого производного настолько высокая, что превосходит интенсивность пика немодифицированного антибиотика не менее, чем на два порядка, и визуально полностью нивелирует его. При увеличении соотношения канамицин/канамицин-**Q**<sup>+</sup> до 200:1 видно, что интенсивности сигналов становятся одного порядка, но интенсивность пика производного **2.96** все равно превосходит таковую для

немодифицированного соединения (рис. 2.48). Таким образом,  $Q^+$ -derivatization снижает предел обнаружения канамицина в MALDI-МС на несколько порядков.



**Рис. 2.48** Спектр MALDI-МС смеси канамицина ( $m/z$  485) [ $M-H^+$ ] и конъюгата **2.96** ( $m/z$  843) в соотношении концентраций 200:1 (0.01M : 0.00005 M) (наносили по 0.9 мкл каждого; матрица – 1-циано-4-гидроксикоричная кислота)

При обработке канамицина избытком соли **2.59** продуктом все равно остается соединение **2.96**: реакционная способность остальных аминогрупп значительно уступает активности группы  $-CH_2NH_2$ . Это свойство было использовано для одновременной детекции нескольких аминогликозидных антибиотиков с помощью масс-спектрометрии. На смесь четырех антибиотиков действовали избытком соли **2.59** и регистрировали MALDI-масс-спектр образующихся аддуктов (рис. 2.49). В полученном масс-спектре видны сигналы аддуктов канамицин- $Q^+$  (**2.96**) ( $m/z$  843, s/n 142.8), сисомицин- $Q^+$  ( $m/z$  806, s/n 166.4), тобрамицин- $Q^+$  ( $m/z$  826, s/n 233.2) и паромомицин- $Q^+$  ( $m/z$  974, s/n 56.7).



**Рис. 2.49** Спектр MALDI-МС смеси модифицированных антибиотиков (матрица – синапиновая кислота); условия см. эксп. часть

Предложенный способ дериватизации аминов трис(2,6-диметоксифенил)метилиевым катионом с последующей регистрацией масс-спектров MALDI является удобным, быстрым и чувствительным методом анализа первичных аминов различной природы. Реакция дериватизации проходит при комнатной температуре, не требует специальной обработки и выделения продуктов, может протекать в различных средах. Метод позволяет не только выводить сигналы аналитов из области матричных шумов, но и увеличивать способности вещества к ионизации, и, следовательно, снижать порог обнаружения целевых соединений методом MALDI, а так же дает возможность анализа продуктов дериватизации методом LDI.

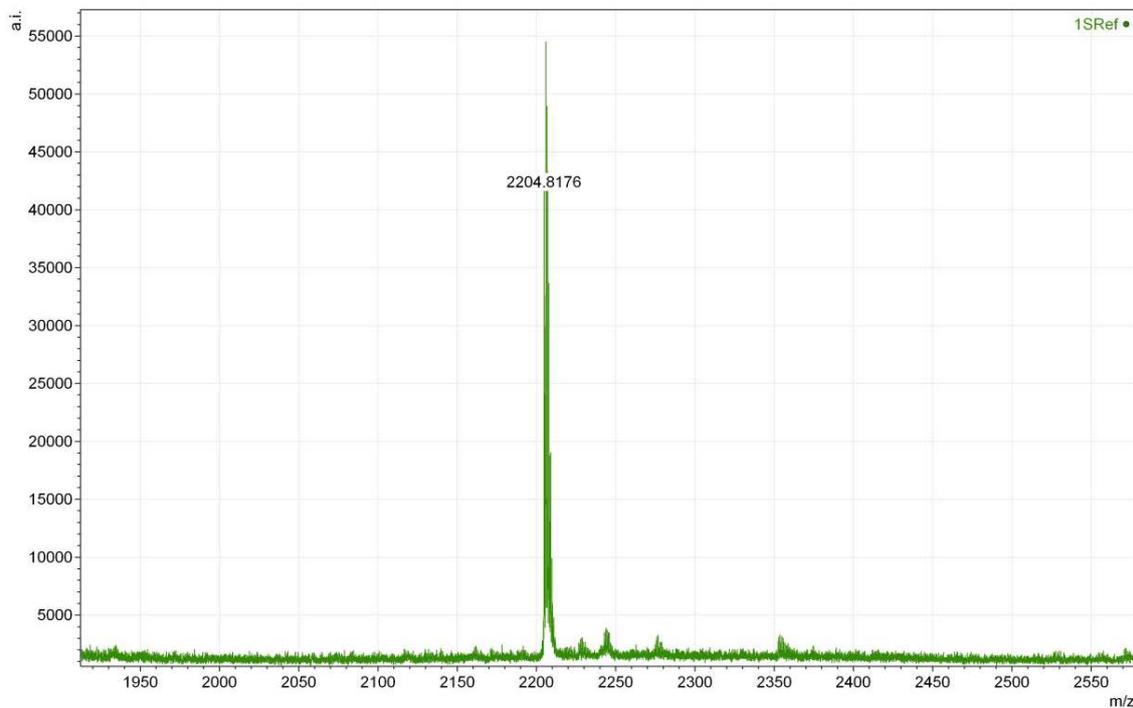
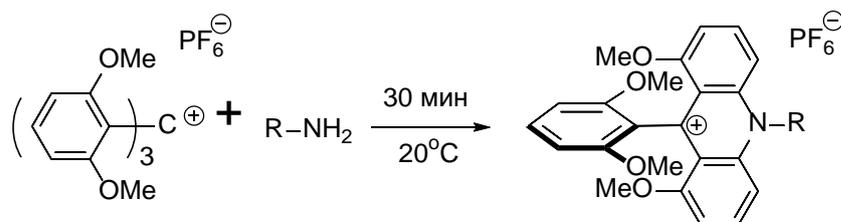
#### **2.2.4 Использование трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона для исследования антибиотического комплекса ИНА-5812**

Антибиотический комплекс из культуры *Streptomyces roseoflavus* ИНА-Ас-5812 получен в результате сорбции на гидрофобной смоле Амберлит XAD-2 с последующим фракционированием с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе и обращенно-фазовой хроматографии на сорбенте С-18. Он представляет собой смесь нескольких компонентов пептидной природы с голубой флуоресценцией, ОФ ВЭЖХ-анализ которой на обращенной фазе представляет значительные трудности. Выделенные с помощью ВЭЖХ фракции были изучены методами масс-спектрометрии и был сделан вывод, что одна из фракций содержит, вероятно, один компонент (масса 1845 Да). Для характеристики аминокислотных компонентов эта фракция была подвергнута кислотному гидролизу, и полученная смесь аминокислот была проанализирована. Установлено наличие в составе молекулы по 1 моль остатков аспарагиновой кислоты (аспарагина), серина, пролина, аланина, лейцина, тирозина и орнитина, 2 моль глицина и трех неидентифицируемых нингидрин-положительных соединений.<sup>2</sup>

С целью дальнейшей характеристики исследуемая фракция была подвергнута дериватизации избытком трис(2,4,6-триметоксифенил)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. Масса полученного производного составила 2204.8 Да (рис. 2.50), т.е. прибавка массы составила, как и ожидалось, 359 Да. Предположительно, дериватизация происходит по боковой аминогруппе орнитина – наименее затрудненной аминогруппе у первичного атома углерода.

---

<sup>2</sup> Эта часть исследования была проведена коллективом лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе.



**Рис. 2.50** MALDI масс-спектр аддукта ИНА-5812-2 с трис(2,4,6-триметоксифенил)метильным катионом.

Как видно из эксперимента дериватизация может служить удобным инструментом для подтверждения наличия или отсутствия той или иной функциональной группы, также с помощью дериватизации можно получить дополнительную структурную информацию.

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

Ещё один важный класс биологически активных органических соединений – тиолы [412–414], их детекция является важной проблемой в таких областях науки как биохимия, аналитическая химия и химия окружающей среды. В литературе описаны различные методы дериватизации и определения тиолов с использованием колориметрии [415], спектрофлуориметрии [416], флуоресцентной микроскопии [417], капиллярного электрофореза [418], ВЭЖХ с УФ-детектором [419] и ВЭЖХ с флуоресцентным детектором [420–423]. Помимо этих методов, дериватизация неионогенными [424–432] и ионогенными [133, 216, 217, 219, 221, 222, 433–440] группами используют в различных масс-спектрометрических подходах для детекции тиолов.

Мы предлагаем простой и удобный метод дериватизации тиолов производным трис(2,6-диметоксифенил)карбениевого катиона для масс-спектрометрического анализа тиолов методами (МА)LDI, NALDI и электрораспылением.

Дериватирующий реагент **2.98** был приготовлен *in situ* путём смешивания эквимольных количествах трис(2,6-диметоксифенил)карбений гексафторфосфата **2.59** и *N*-(2-аминоэтил)малеимида **2.97** в ацетонитриле в присутствии избытка триэтиламина (рис. 2.51). Процесс конверсии происходит количественно и катион **2.59** не детектируется в реакционной смеси (рис 2.52 А,В). Соединение **2.98**, содержит в себе постоянный положительный заряд в тритил/акридиниевом фрагменте ( $pK_{R^+} \sim 18$  (см. экспериментальную часть)) и малеимидную функциональную группу, которая мягко реагирует с тиолами с образованием аддуктов  $M^+-SR$  (рис. 2.51, рис 2.52 с, таблица 2.4).

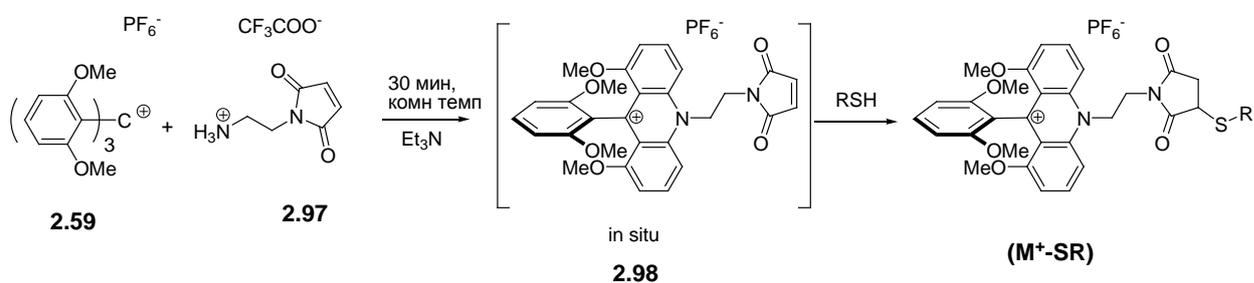


Рис. 2.51 Синтез реагента **2.98** и ковалентная дериватизация этим реагентом тиолов.

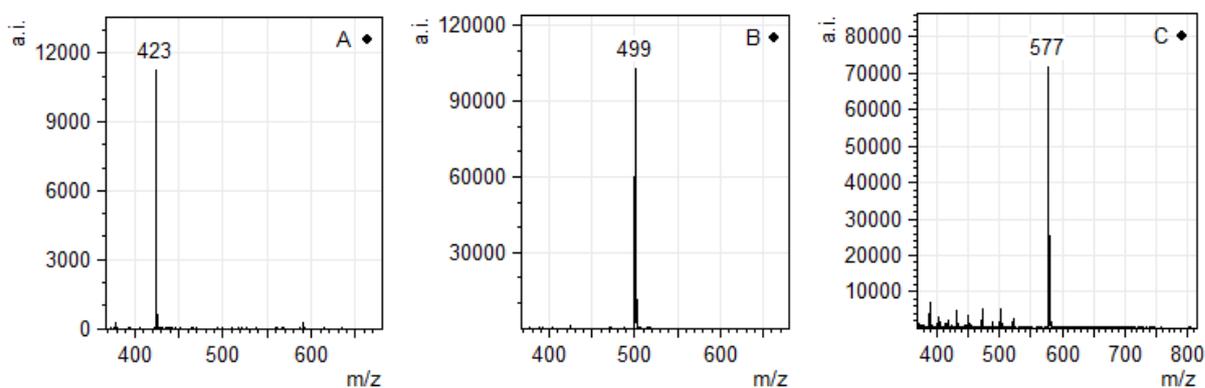


Рис. 2.52 MALDI масс-спектр соединения **2.59** (А), **2.98** (В), и **2.100** (С, R =  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) (матрица – синапиновая кислота).

Реакция превращения катиона **2.59** в реагент **2.98** сопровождается изменением цвета реакционной смеси от фиолетового до красного. Свежеприготовленный раствор **2.98** пригоден для дериватизации тиолов по крайней мере в течение 1 недели. При длительном хранении в растворе малеимидная группа может разрушаться под действием воды или других нуклеофилов.

Реагент **2.98** имеет молекулярную массу 499 Да, таким образом масса исследуемого тиола увеличивает на эту величину. Отметим, что в условиях MALDI-МС тиолы могут быть детектированы в различных матрицах (НАВА, синапиновая кислота, АТ, IAA,

THAP, CHCA), однако наилучшие результаты достигаются при использовании синапиновой кислоты, HABA 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 (рис. 2.53). Для конъюгата **2.99** нижний предел детекции тиолов методом MALDI-МС составил  $5 \times 10^{-6}$  моль в ячейке масс-спектрометра.

Затем мы исследовали дериватизацию различных тиолов (табл. 2.4) для установления границ применимости нашего метода.

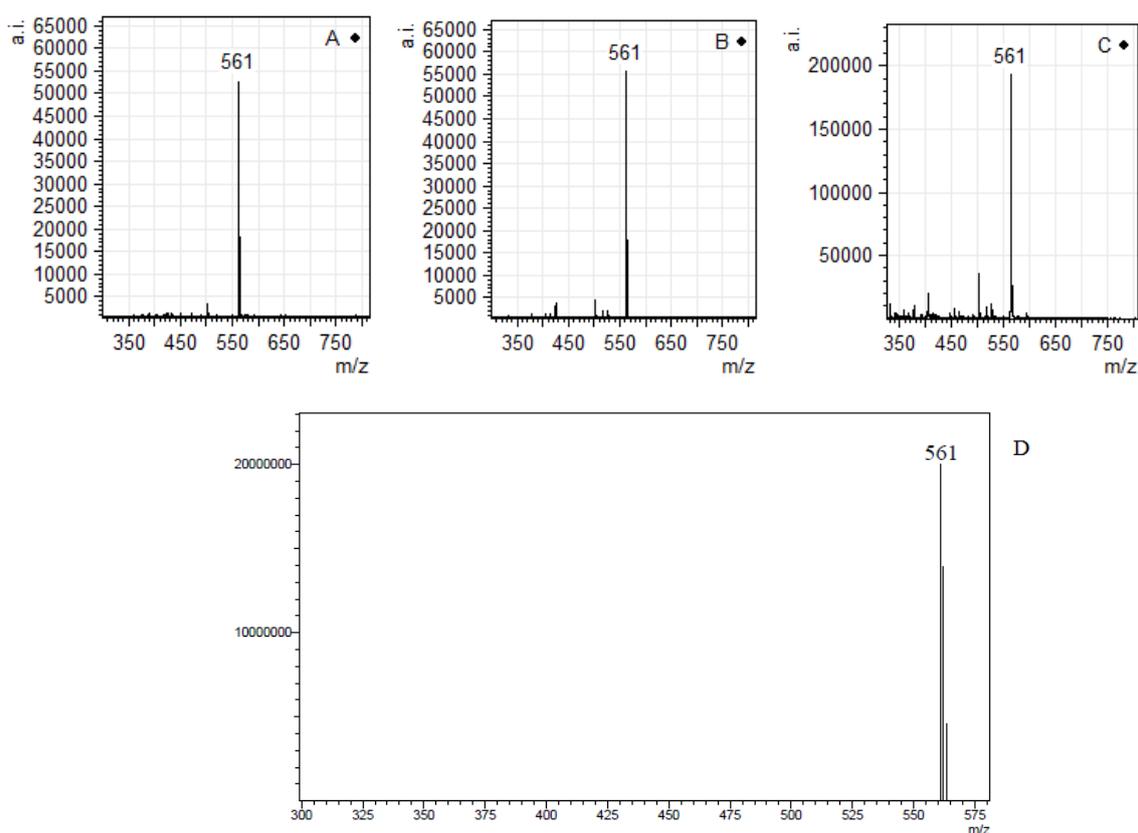
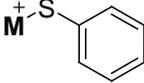
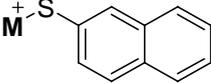
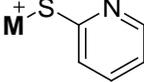
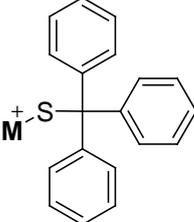
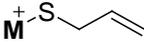
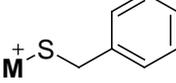
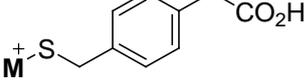
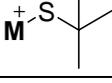
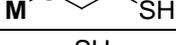
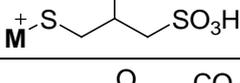
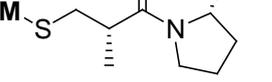
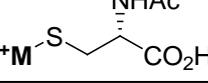


Рис. 2.53 Спектры MALDI-МС (А), LDI-МС (В), NALDI-МС (С), электрораспыления (D) соединения **2.99**.

Таблица 2.4 Список тиолов и их конъюгатов использованных для MALDI-МС анализа (матрица – синапиновая кислота).

#	Тиол	Продукт дериватизации ( $M^+-SR$ ) <sup>a</sup>	$m/z$ (I, %) <sup>б</sup>
<b>2.99</b>	этантиол	$M^+-S-CH_2CH_3$	561 (100)
<b>2.100</b>	2-меркаптоэтанол	$M^+-S-CH_2CH_2OH$	577 (100)
<b>2.101</b>	тиогликолиевая кислота	$M^+-S-CH_2CO_2H$	591 (100)
<b>2.102</b>	6-меркаптогексанол	$M^+-S-(CH_2)_5OH$	633 (100)
<b>2.103</b>	6-меркаптогексановая	$M^+-S-(CH_2)_5CO_2H$	647 (100)

	кислота		
2.104	тиофенол		609 (100)
2.105	2-нафталинтиол		659 (100)
2.106	2-пиридинтиол		610 (100)
2.107	трифенилметантиол		775 (29)
2.108	аллилтиол		573 (100)
2.109	бензилтиол		623 (100)
2.110	4-тиометилфенилуксусная кислота		681 (100)
2.111	<i>трет</i> -бутилтиол		589 (100)
2.112	этандитиол-1,2		593 (100)
2.113	унитиол		687 (16)
2.114	каптоприл		716 (100)
2.115	<i>N</i> -ацетилцистеин		662 (100)

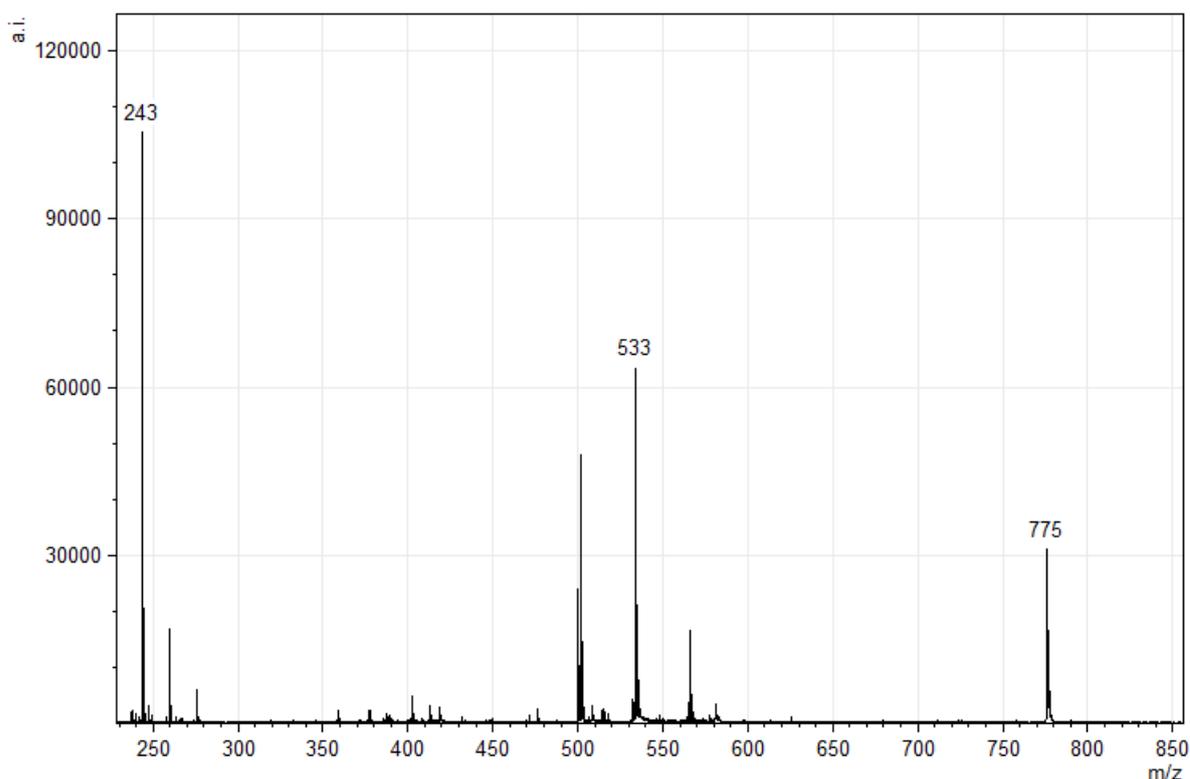
<sup>a</sup> Структуру  $M^+$  см. рис. 2.51

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

Важно отметить, что во всех случаях MALDI масс-спектры содержали интенсивный пик соответствующих катионов  $M^+-SR$  (рис 2.51). Примечательно, даже для стерически затрудненных *трет*-бутилтиола и низконуклеофильных тиолов (тиофенол, 2-нафталинфенол, 2-пиридинтиол) наблюдаются интенсивные пики продуктов их дериватизации **2.111**, **2.104**, **2.105**, **2.106**.

Взаимодействие с катионом **2.98** избытка трифенилметантиола ведет к образованию продукта **2.107**, в спектре MALDI которого, помимо ожидаемого сигнала  $M^+-S-CPh_3$  ( $m/z$  775) присутствуют дополнительные сигналы катиона  $M^+-SH$  ( $m/z$  533) и

трифенильного катиона  $\text{Ph}_3\text{C}^+$  ( $m/z$  243) (рис. 2.54). Во многих случаях в спектрах MALDI - MS наблюдался пик  $m/z$  502, мы предполагаем, что в условиях лазерной десорбции/ионизации происходит частичный разрыв связи C-S с образованием сукцината соответствующей массы. Напротив, в случае ионизации электрораспылением подобная фрагментация не наблюдалась.



**Рис. 2.54** Спектр MALDI-МС **2.107** (матрица – синапиновая кислота).  $\text{M}^+$ -S-CPh<sub>3</sub> ( $m/z$  775),  $\text{M}^+$ -SH ( $m/z$  533),  $\text{Ph}_3\text{C}^+$  ( $m/z$  243 ).

Стоит отметить, что масс-спектр MALDI продукта дериватизации бис-тиола (этандитиол-1,2) содержит только пик, соответствующий функционализации только по одной SH-группе, как в случае реакции при избытке катиона, так и при избытке тиола.

Тиольная функциональная группа входит в структуру муколитических лекарственных препаратов (цистеин, *N*-ацетилцистеин, месна) [441], ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (каптоприл) [442] и хелатирующих агентов (димеркаптол, унитиол) [443]. Мы предприняли попытку определить некоторые лекарственные препараты с использованием предложенного дериватирующего **2.98**. На рисунке 2.55 представлены спектры дериватизированных *N*-ацетилцистеина (**2.115**), каптоприла (**2.114**) и унитиола (**2.113**).

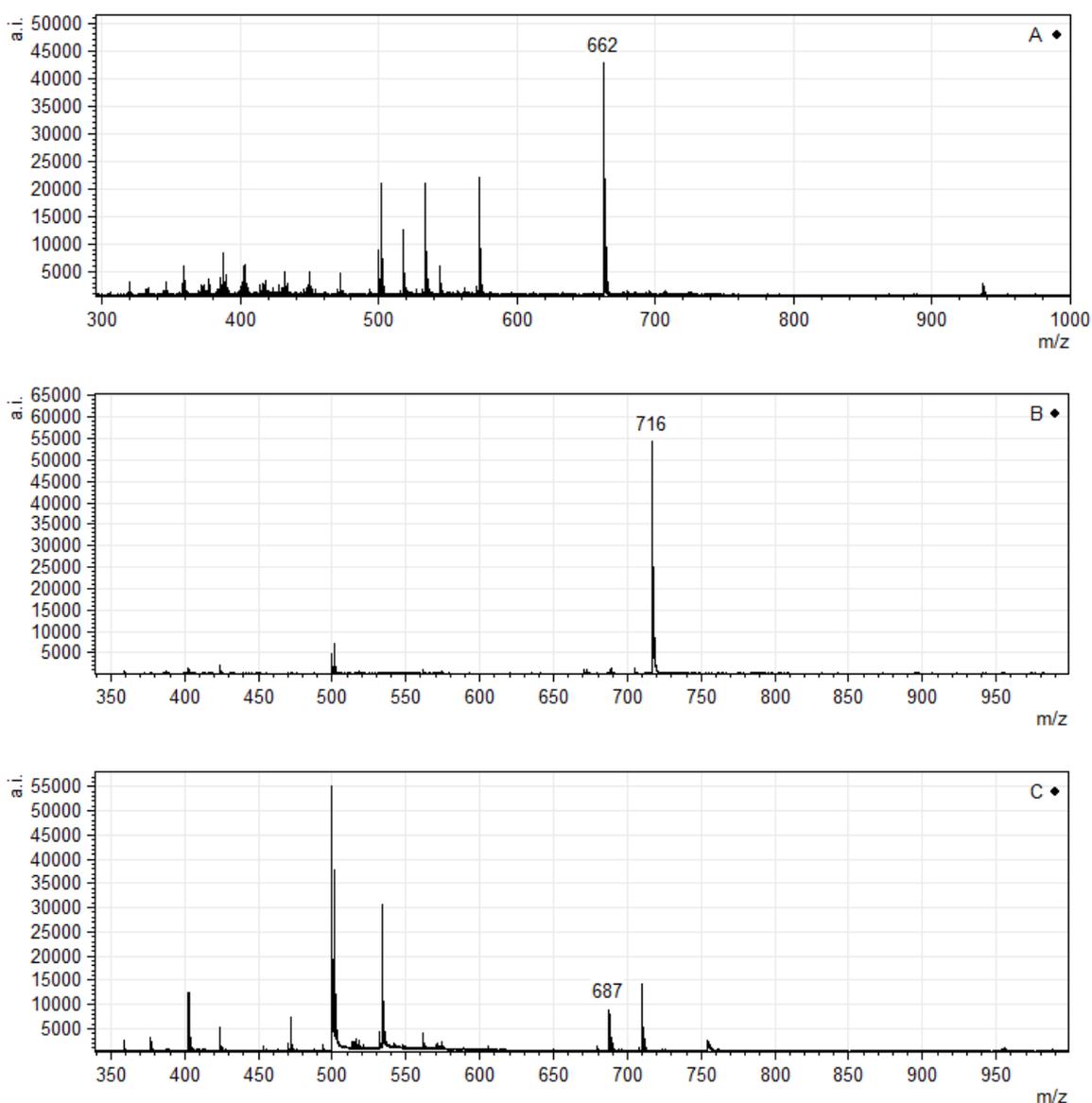
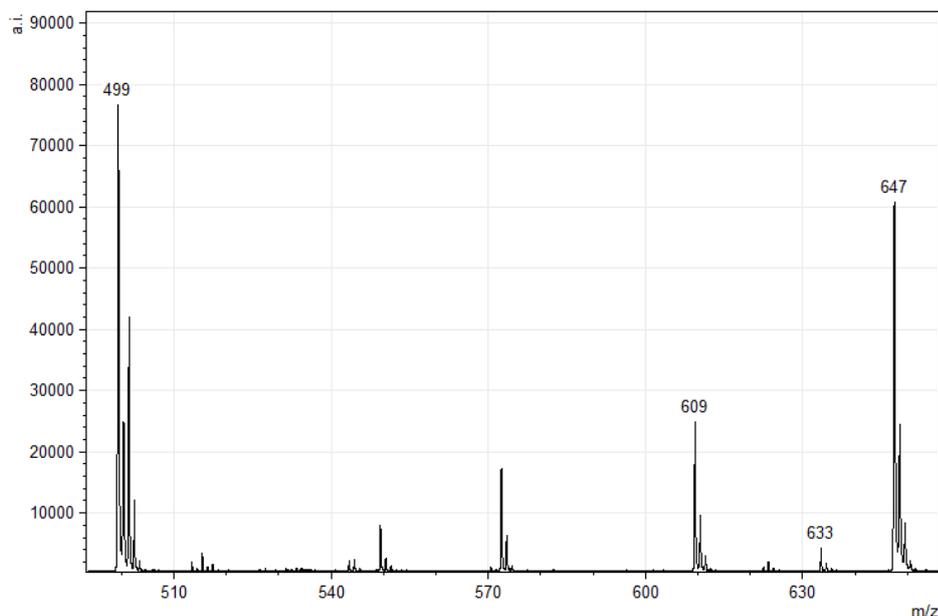


Рис. 2.55 Спектры MALDI-МС **2.115** (A), **2.114** (B), **2.113** (C).

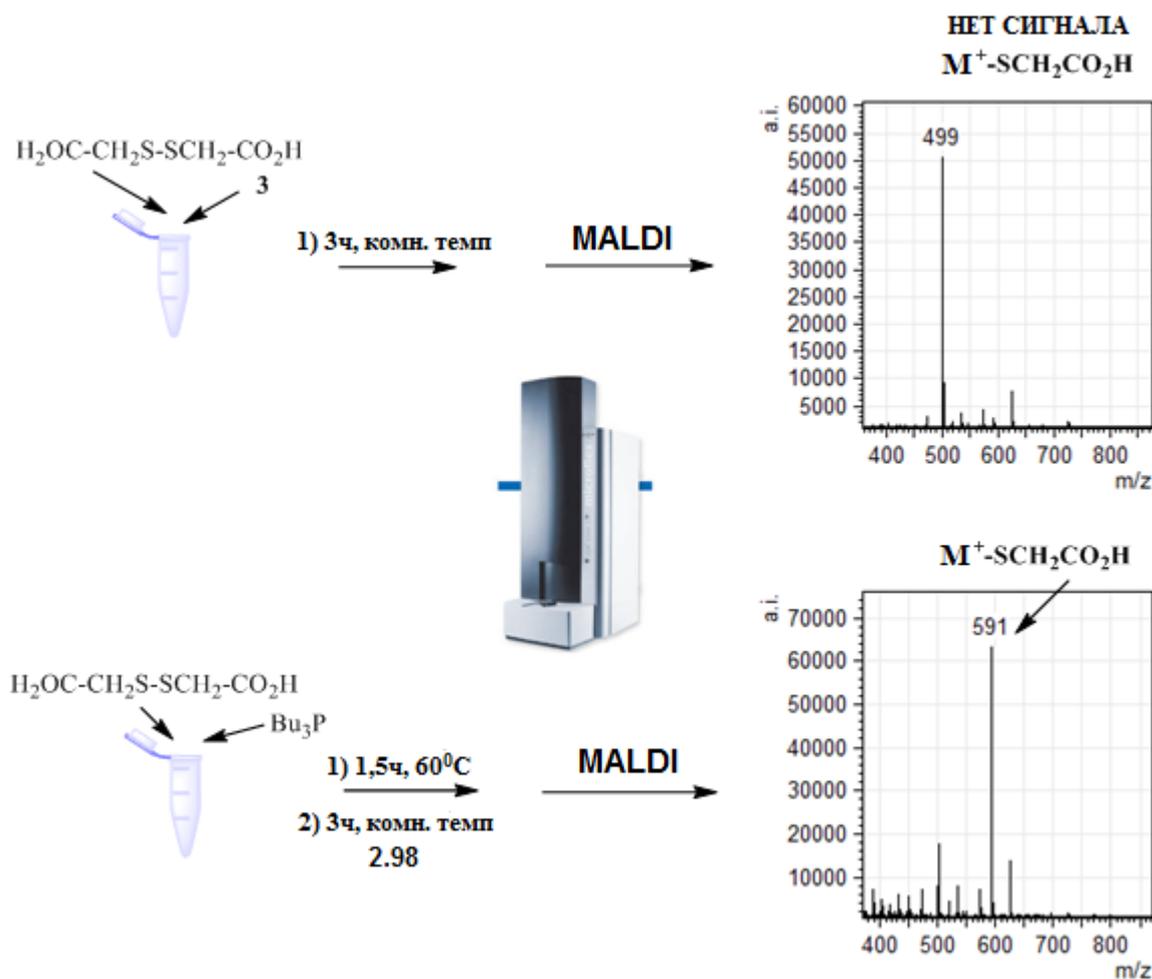
Помимо исследования модификации индивидуальных тиолов, нами также были дериватизированы их смеси. Смесь тиофенола, 6-меркаптогексанола и 6-меркаптогексановой кислоты была обработана избытком реагента **2.98**. В масс-спектре (рис 2.56) мы видим сигнал каждого продукта дериватизации и избытка реагента **2.98**.

Тиольная группа очень легко окисляется и в природных соединениях зачастую встречается в форме дисульфида. Поскольку малеимидная группа реагирует только с SH-группой, для анализа дисульфидов необходимо восстановить связь S-S. Мы предложили последовательную *one pot* процедуру восстановления дисульфидов с помощью  $\text{Bu}_3\text{P}$  с последующей дериватизацией продукта восстановления масс-спектрометрической меткой **2.98**, и показали применение этой метки на примере модификации дитиогликолиевой кислоты. На рисунке 2.57 в масс-спектре мы видим четкий сигнал катиона  $\text{Q}^+ \text{-SCH}_2\text{CO}_2\text{H}$

( $m/z$  591), однако в контрольном эксперименте (без стадии восстановления) масс-спектр содержит только сигнал реагента **2.98** ( $m/z$  499).



**Рис. 2.56** Спектр MALDI-МС реакции тиофенола, 6-меркаптогесанола и 6-меркаптогесановой кислоты с избытком реагента **2.98** ( $m/z$  499).  $M^+$ -SPh ( $m/z$  609),  $M^+$ -S(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ( $m/z$  633),  $M^+$ -S(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO<sub>2</sub>H ( $m/z$  647).

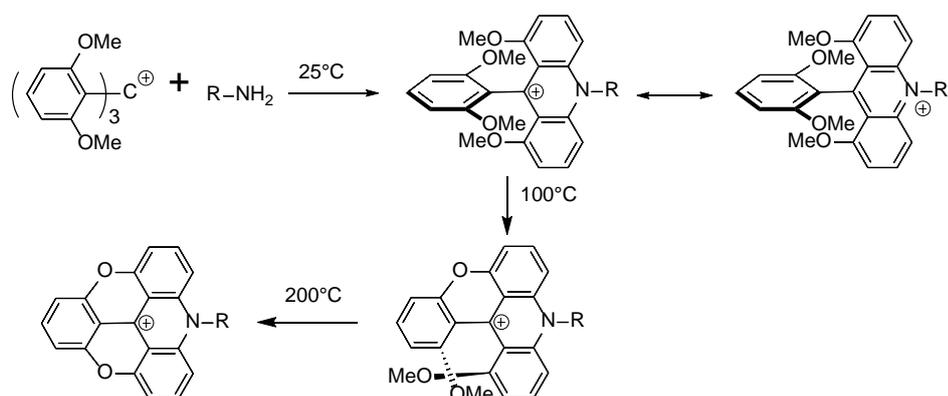


**Рис. 2.57** Определение дисульфидов с помощью двухстадийной *one pot* реакции восстановления-derivатизации.

Важным преимуществом представленного подхода является не только то, что сигнал аналита сдвигается («уходит») из «области шумов» за счет увеличения массы на значительный инкремент (499 Да), но также и улучшение эффективности ионизации, благодаря введению в молекулу постоянного положительного заряда. Другими преимуществами метода служат доступность реагентов, простые экспериментальные процедуры и возможность проводить derivатизацию как в водных, так и в неводных растворах.

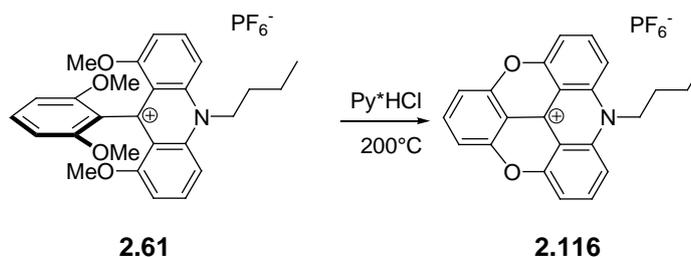
### 2.2.6 Синтез и масс-спектрометрические свойства производных триангуленового катиона

Как было сказано в начале главы, при продолжительном нагревании акридиновый катион последовательно циклизуется в триангуленовый.

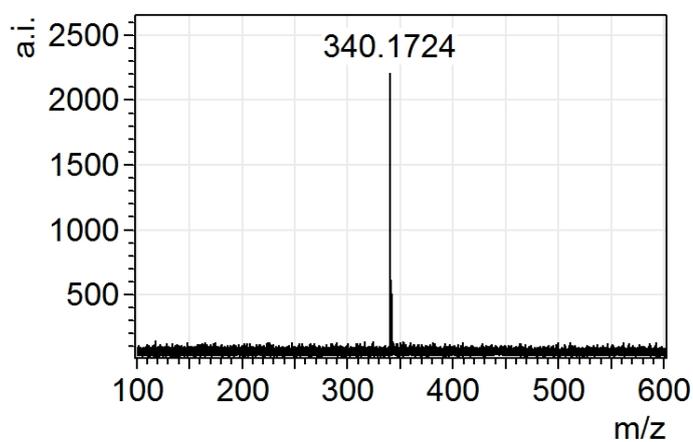


Это свойство мы решили использовать для синтеза триангуленовой масс-спектрометрической неотщепляемой метки. Несмотря на то, что акридиновая метка на основе трис(2,6-диметоксифенил)метилиевого катиона оказалась удобным derivатизирующим агентом для аминогрупп различной природы, у нее есть ряд недостатков. Во-первых, при работе в щелочных средах (например, в среде аммиака) может происходить частичная циклизация акридиниевого катиона, в результате которой будут образовываться побочные соединения, усложняющие идентификацию веществ в масс-спектре. Во-вторых, объемная структура акридиниевой группы ограничивает возможности ее связывая с различными участками биополимеров. Плоская и зациклизованная триангуленовая метка лишена этих недостатков.

На модельном субстрате мы отработали условия реакции и выделения продукта циклизации [389].

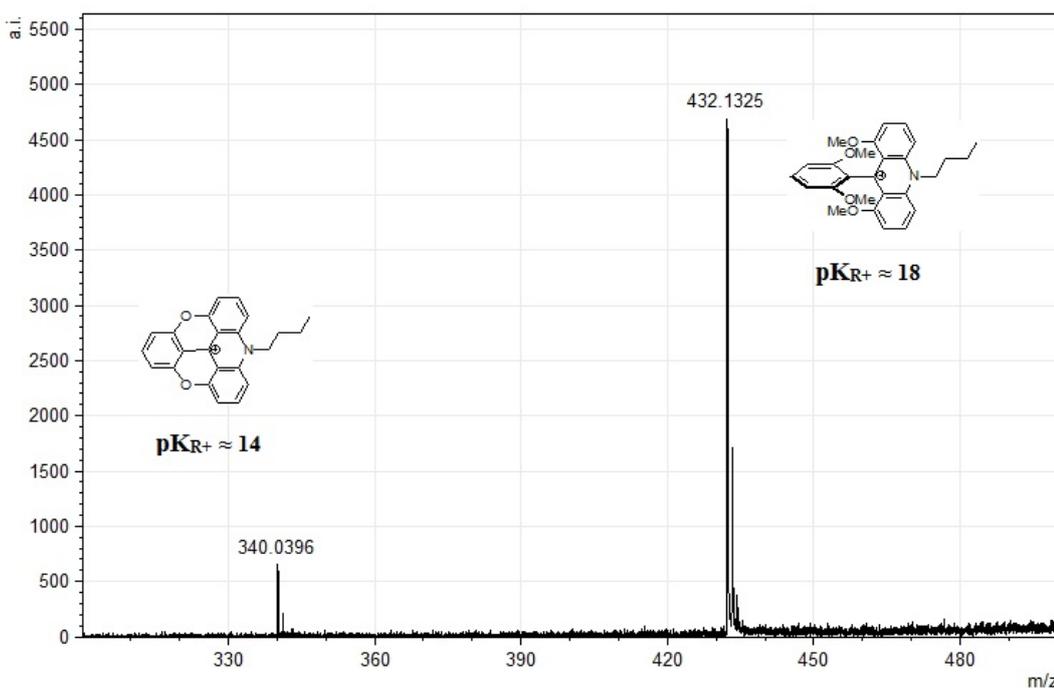


Несмотря на жесткие условия реакции, удалось достичь хорошего выхода продукта (76%). Продукт **2.116** был выделен, очищен колоночной хроматографией, а его структура доказана 2D ЯМР спектроскопией. В спектре MALDI-МС виден четкий сигнал триангуленового катиона (рис. 2.58)



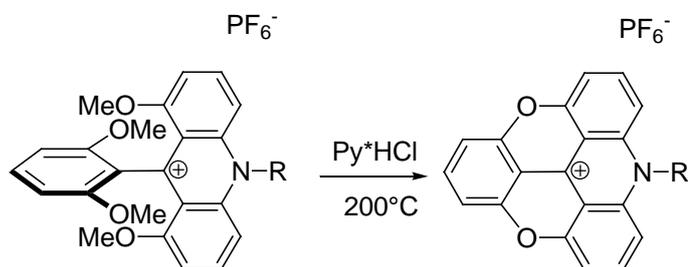
**Рис. 2.58** Спектр MALDI-МС соединения **2.116** (матрица -  $\alpha$ -цианокоричная кислота)

Следующим шагом мы оценили величину  $pK_{R+}$  для соединения **2.116**, она оказалась равной 14.5, против 18.1 для соединения **2.61**, что указывает на то, что акридиниевый катион более стабилен. К такому же выводу можно прийти, если сравнить интенсивности сигналов в масс-спектре при их эквимольном присутствии в смеси (рис. 2.59).

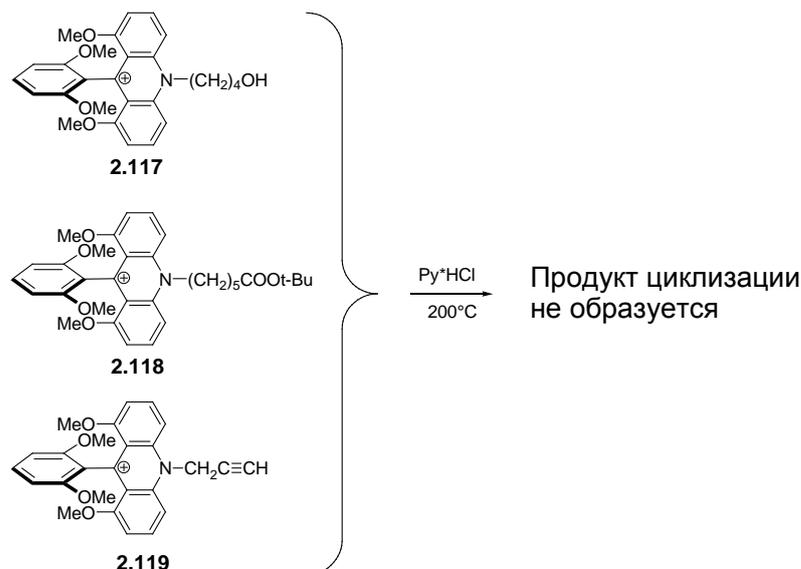


**Рис. 2.59** Спектр MALDI-МС эквимольной смеси (10 мМ) соединений **2.61** и **2.116** (матрица -  $\alpha$ -цианокоричная кислота).

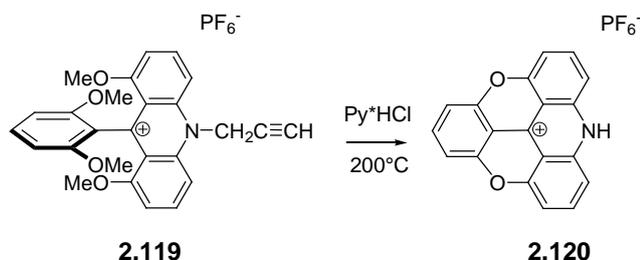
Описанные в литературе производные триангуленового катиона не отличаются большим разнообразием и возможностью функционализации:



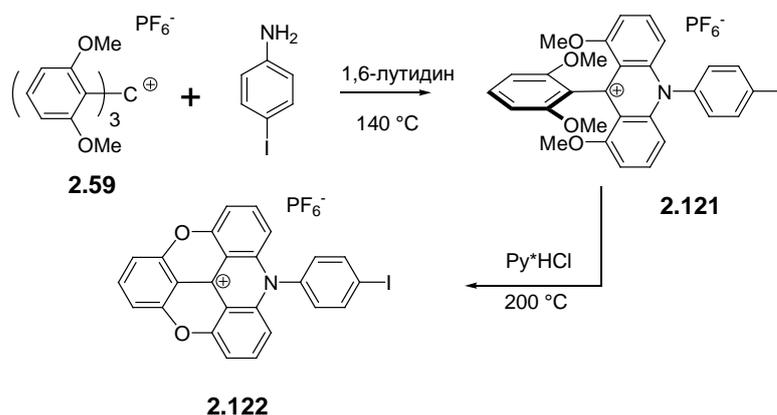
По-видимому, жесткие условия циклизации (высокая температура и кислая среда) препятствуют получению функционализированных производных. Нами были предприняты несколько неудачных попыток получить продукты циклизации, содержащие гидроксидную, карбоксильную и алкиновую группы.



Отметим, что в случае циклизации акридиниевого субстрата, содержащего пропаргильный радикал (**2.119**), была выделена и охарактеризована соль (**2.120**).

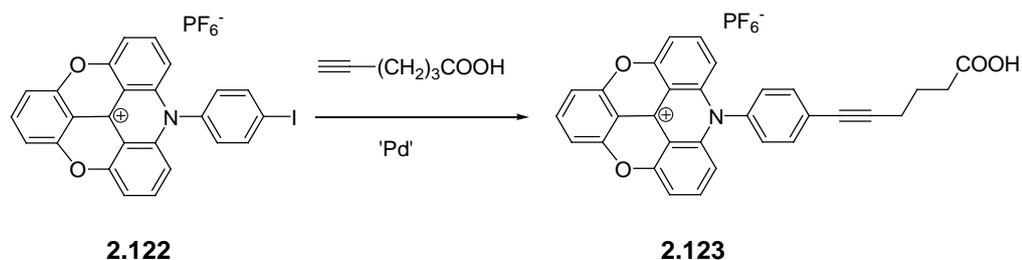


Для решения этой проблемы (введение функциональной группы в триангуленовый катион) нами был предложен следующий подход:

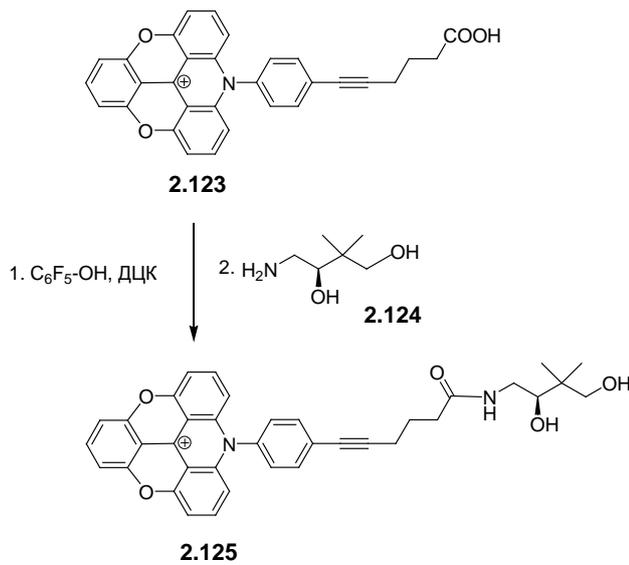


На первой стадии трис(2,6-диметоксифенил)метильный катион **2.59** реагирует с 4-иоданилином. В отличие от алифатических субстратов, менее нуклеофильный 4-иоданилин вступает в реакцию только при 140°C, а затем полученное акридиниевое производное **2.121** циклизуется в иодсодержащий триангуленовый субстрат **2.122**.

Наличие в структуре **2.122** атома иода в ароматическом кольце открывает возможности проведения реакций кросс-сочетания. Мы продемонстрировали возможность проведения палладий-катализируемой реакции Соногаширы с участием субстрата **2.122**:



Полученная кислота **2.123** после превращения в активированный пентафторфениловый эфир может реагировать с аминами:



Соединение **2.125** было выделено и охарактеризовано, его структура доказана с помощью  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  ЯМР-спектроскопии и 2D ЯМР корреляций (см. эксперимент. часть). (3*R*)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диол<sup>3</sup> **2.124** выбран не случайно – он служит удобной моделью дезоксирибозы, и его производные могут быть использованы в синтезе олигонуклеотидов, содержащих одновременно УФ- и масс-спектрометрическую метку.

Неотщепляемые масс-спектрометрические метки получили широкое распространение в масс-спектрометрическом анализе благодаря простоте и удобству использования. Дериватизация в некоторых случаях значительно повышает чувствительность анализа и заметно упрощает задачу интерпретации масс-спектров. Представленный нами подход модификации различных соединений с использованием трис-(2,6-диметоксифенил)карбениевого катиона и его производных не ограничивается описанным кругом amino- и тиолсодержащих соединений. Он имеет большой потенциал для дериватизации и по другим функциональным группам с использованием соответствующих линкеров.

<sup>3</sup> Вещество синтезировано и любезно предоставлено И.О. Апариним.

## Экспериментальная часть

В работе использовали коммерческие реагенты: дисукцинимидил карбонат, пропаргиламин, азид натрия, иодид меди (I), ТБТА, ПАМАМ, *N*-оксисукцинимидный эфир 6-(11,12-дидегидродибензо[*b,f*]азоцин-5(6*H*)-ил)-6-оксогексановой кислоты, *трет*-бутиловый эфир гекс-5-иновой кислоты, трихлорэтилен, трихлоруксусная кислота, пентагидрат сульфата меди (II), диизопропилэтиламин, 4-иодфенол, карбонат калия, метил иодид, триметилсилилацетилен, фенилацетилен, дифенилацетилен (толан), 1,4-диодбензол, периодат натрия, иод, метиловый эфир 4-иодбензойной кислоты, 1,2,4,5-тетраметилбензол, периодная кислота дигидрат, трихлоруксусная кислота, 1,2-диметоксиэтан, анизол, бензилиден хлорид, *трет*-бутилат калия, оксалил хлорид, 1,3-диметоксибензол, 1,3,5-триметоксибензол, морфолин, ацетилацетон, этил цианоацетат, ДБУ (DBU), 2,2,6-триметил-4*H*-1,3-диоксин-4-он, анилин, этаноламин, ацетат натрия, тиофенол, дисульфид углерода, тиомочевина, *n*-бутиламин, бензиламин, 4-аминобутанол, малонитрил, диэтилкарбонат, *O*-бензилгидроксиламина гидрохлорид, 4-иоданилин, пентафторфенол, дициклогексилкарбодиимид, уксусная кислота, триэтиламин (приобретались у фирм Aldrich, Fluka, Lancaster и Avocado); антибиотик канамицин (ОАО «Биохимик», г. Саранск, Россия), сисомицин, тобрамицин, паромомицин (Минхимпром СССР).

В работе использовали следующие растворители: диметилсульфоксид, ацетонитрил (Panreac), остальные растворители – (Химмед и ЭКОС-1) квалификации "х.ч." (гексан, метанол, дихлорметан, этилацетат, хлороформ, этанол, пропанол-2) и "о.с.ч." (толуол, ацетон, бензол, диэтиловый эфир, 2,6-диметилпиридин). Дихлорметан очищали перегонкой над гидридом кальция, ДМФА очищали перегонкой над гидридом кальция в вакууме и хранили над молекулярными ситами 3Å.

За ходом реакций следили с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck); пятна визуализировали в УФ-свете при 254 нм. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер – частиц 40–63 мкм. Растворы упаривали на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при температуре бани 30–50°C.

Спектры ЯМР ( $\delta$  м.д.,  $J$  Гц) регистрировали при 500 МГц ( $^1\text{H}$ ), 125 МГц ( $^{13}\text{C}$ ) на спектрометре Bruker AC-500. Спектры калиброваны по остаточным сигналам протонов растворителя: DMSO-*d*<sub>6</sub> (2.50 м.д. для  $^1\text{H}$  и 39.7 м.д. для  $^{13}\text{C}$ ), CDCl<sub>3</sub> (7.25 м.д. для  $^1\text{H}$  и 77.0 м.д. для  $^{13}\text{C}$ ), CD<sub>3</sub>CN (1.94 м.д. для  $^1\text{H}$  и 1.32 м.д. для  $^{13}\text{C}$ ), D<sub>2</sub>O (4.79 м.д. для  $^1\text{H}$ ) и

$\text{CD}_3\text{NO}_2$  (4.33 м.д. для  $^1\text{H}$  и 62.8 м.д. для  $^{13}\text{C}$ ). Химические сдвиги приведены относительно  $\text{SiMe}_4$  ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ). Температуры плавления определены на нагревательном столике Voetius. Для ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1100 с мультиволновым детектором на основе диодной матрицы на обращенно-фазовой колонке Symmetry C8, Waters в следующих условиях: скорость потока 1мл/мин, градиент ацетонитрила – от 50% до 70% за 20 мин, от 70% до 98% за 10 мин.

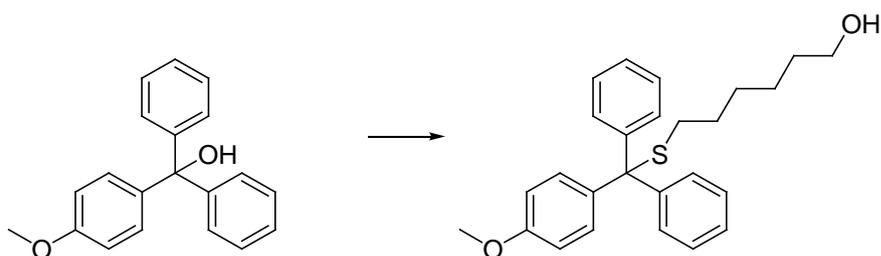
Масс-спектрометрический анализ всех полученных соединений осуществляли с использованием времяпролетного MALDI масс-спектрометра Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Germany). В качестве матрицы использовали растворы синапиновой кислоты,  $\alpha$ -цианокоричной кислоты, 2,4,6-тригидроксиацетофенона. (20 мг/мл, 50% ацетонитрил в 0,1% ТФУ). Образец на стальную 384-точечную масс-спектрометрическую мишень (MTP 384 target plate ground steel TF производства Bruker Daltonics, Германия) наносили методом высушенной капли (1 мкл раствора анализируемого вещества смешивали на масс-спектрометрической мишени с 1 мкл раствора матрицы и высушивали на воздухе). Десорбцию образцов осуществляли иррадиацией азотным лазером (длина волны 337 нм), работающим при частоте 50 Гц. Регистрацию положительно заряженных ионов проводили в отражательном режиме в соответствующем диапазоне масс. Для калибровки масс-спектрометра использовали калибровочные смеси, содержащие пептиды. Для проведения дериватизации, растворения аналитов и матричных соединений использовали ацетонитрил (HPLC-grade, J.T. Baker), метанол (HPLCgrade, Merck), хлороформ (HPLC-grade, Merck), ультрачистую воду типа I, полученную с использованием системы Milli-Q (Millipore). Анализ полученных масс-спектрометрических данных проводили с использованием программного пакета FlexAnalyses 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) и mMass (Open Source Mass Spectrometry Tool).

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 100 (Agilent).

Расчёты структур участников модельного механизма превращений проводились посредством программного пакета Gaussian-09 [454] полуэмпирическим методом PM3 с полной оптимизацией геометрических параметров молекул реагентов и продуктов. Последующее вычисление частот нормальных колебаний по стандартной процедуре пакета Gaussian-09 показало, что рассчитанные структуры отвечают критериям стационарной точки (минимумы и седловые точки ППЭ). Визуализация результатов расчётов проводилась при помощи программы ChemCraft [455].

### Общая методика синтеза триарилметилтиогексанолов

Триарилметанол (5.6 ммоль) растворили в ДХМ (15 мл), к полученному раствору добавили 6-меркаптогексанол (6.24 ммоль, 1.1 экв.) и уксусную кислоту (1.5 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 дней (ход реакции контролировали методом ТСХ) к реакционной смеси добавили ДХМ (10 мл) и последовательно промыли водой (25 мл), насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (25 мл), водой (25 мл). Органический слой отделили, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле.



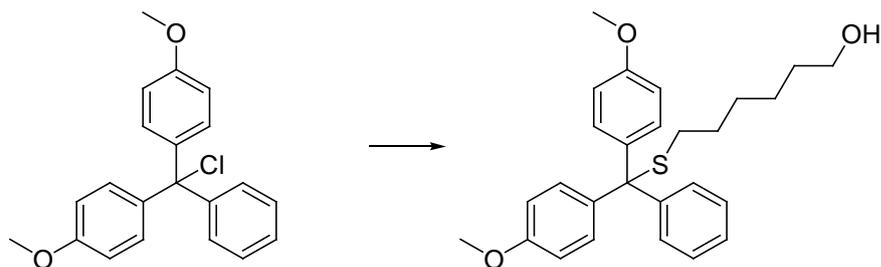
#### 6-[(4-Метоксифенил)-бис-фенил-метилтио]гексанол (2.1).

Выход 57 % ( $R_f = 0.4$ , ТСХ в системе PhMe:EtOAc=4:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ), светло-желтое масло.

Система для хроматографирования PhMe:EtOAc с градиентом от 10:1 до 3:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ .

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.13 (м, 4H), 1.29 (м, 4H), 2.07 (т, 2H,  $J = 7.3$  Гц,  $\text{SCH}_2$ ), 3.31 (м, 2H), 3.72 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.27 (т, 1H,  $J = 5.1$  Гц,  $-\text{OH}$ ), 6.87 (д, 2H,  $J = 8.80$  Гц), 7.13–7.26 (м, 4H), 7.26–7.39 (м, 8H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 24.95, 28.09, 28.22, 31.28, 32.22, 55.00, 60.52, 65.46, 113.16, 126.45, 127.83, 128.94, 130.25, 136.40, 144.91, 157.61.



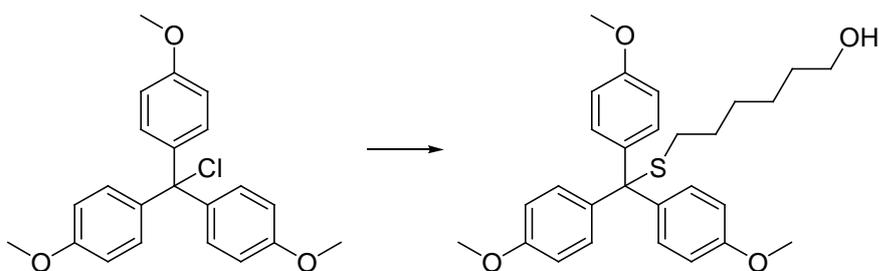
#### 6-[(Фенил-бис-[4-метоксифенил])метилтио]гексанол (2.1').

Выход 81 % ( $R_f = 0.4$ , ТСХ в системе PhMe:EtOAc=4:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ), светло-желтое масло.

Система для хроматографирования PhMe:EtOAc с градиентом от 20:1 до 5:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ .

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.14 (м, 4H), 1.29 (м, 4H), 2.07 (т, 2H,  $J = 7.3$  Гц,  $\text{SCH}_2$ ), 3.31 (м, 2H), 3.72 (с, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.28 (т, 1H,  $J = 5.1$  Гц,  $-\text{OH}$ ), 6.86 (д, 4H,  $J = 8.8$  Гц), 7.18 (м, 5H), 7.29 (м, 4H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 24.98, 28.13, 28.25, 31.32, 32.23, 54.99, 60.54, 64.98, 113.12, 126.38, 127.81, 128.84, 130.17, 136.78, 145.29, 157.56.



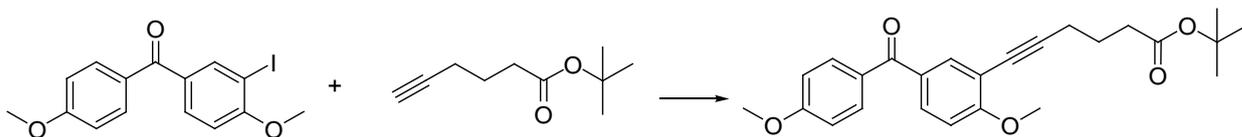
**6-[(Трис-4-метоксифенил)метилтио]гексанол (2.1'').**

Выход 66 % ( $R_f = 0.4$ , ТСХ в системе PhMe:EtOAc=6:1 + 1% Et<sub>3</sub>N), светло-желтое масло.

Система для хроматографирования *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOAc с градиентом от 3:2 до 1:1 + 1% Et<sub>3</sub>N.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.14 (м, 4H), 1.29 (м, 4H), 2.08 (т, 2H,  $J = 7.3$  Гц, SCH<sub>2</sub>), 3.31 (м, 2H), 3.72 (с, 9H, -OCH<sub>3</sub>), 4.27 (т, 1H,  $J = 5.1$  Гц, -OH), 6.85 (д, 6H,  $J = 8.8$  Гц), 7.18 (д, 6H,  $J = 8.8$  Гц).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 25.00, 28.18, 28.26, 31.37, 32.23, 54.99, 60.55, 64.51, 113.08, 130.06, 137.18, 157.51.

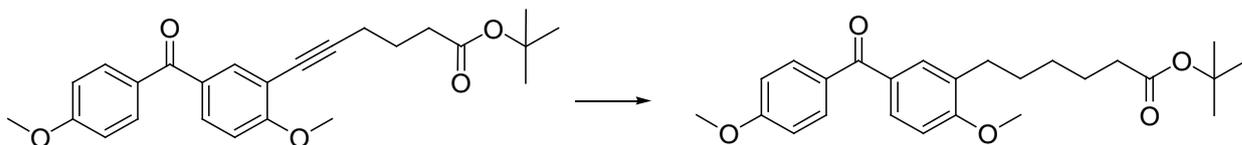


**4,4'-Диметокси-3-(5-трет-бутоксикарбонилпент-1-инил)бензофенон (2.4) [202].**

4,4'-Диметокси-3-йодобензофенон (5.00 г, 13 ммоль), *трет*-бутилгекс-5-иноат (3 г, 17 ммоль), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (10 моль%, 1.57 г), CuI (20 моль%, 500 мг) и Et<sub>3</sub>N (10 мл) добавили к ДМФА (50 мл) в инертной атмосфере. Смесь выдерживали в течение 10 ч в атмосфере аргона при комнатной температуре. За ходом реакции следили методом ТСХ в системе PhMe:EtOAc = 5:1 ( $R_f$  0.55). Растворитель удалили при пониженном давлении. К сухому остатку добавили 250 мл этилацетата и 250 мл воды. Органический слой последовательно промыли 250 мл насыщенного водного раствора Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA и 250 мл насыщенного водного раствора NaCl. Органический слой высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле в системе PhMe:EtOAc = 10:1. Выход 5.18 г (94%), коричневое масло.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.39 (с, 9H, *t*-Bu), 1.65–1.81 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34–2.41 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.42–2.50 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.85 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.91 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7.04–7.11 (м, 2H, CH<sub>Ar</sub>), 7.17 (д, 1H,  $J = 8.8$  Гц), 7.63–7.74 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 18.2, 23.7, 27.7, 33.6, 54.9, 55.5, 56.0, 76.6, 79.6, 94.4, 110.9, 112.1, 113.8, 129.7, 129.8, 131.4, 131.8, 134.3, 162.5, 162.7, 171.8, 192.6.

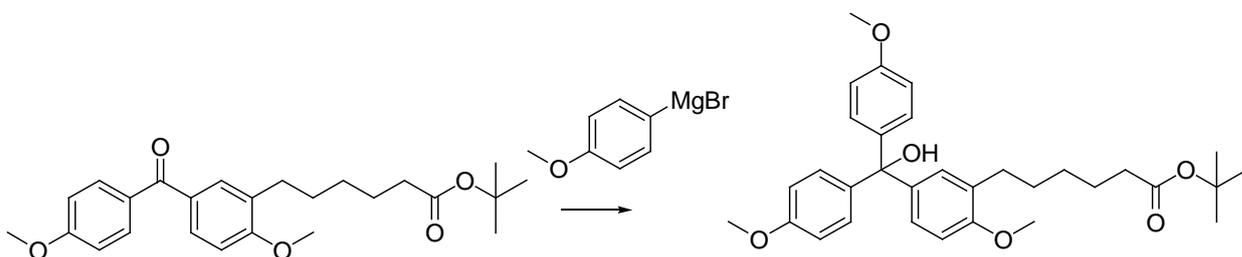


**4,4'-Диметокси-3-(5-*tert*-бутоксикарбонилпентил)бензофенон (2.5)** [202].

4,4'-Диметокси-3-(5-*tert*-бутоксикарбонилпент-1-инил)бензофенон (3 г, 7.3 ммоль) растворили в EtOAc (120 мл). Затем к полученному раствору добавили 0.5 г Pd/C (10%) и смесь перемешивали в течение 6 суток в атмосфере водорода. За ходом реакции следили методом ТСХ в системе PhMe:EtOAc = 7:1 ( $R_f$  0.7). Pd/C отфильтровали, растворитель упарили при пониженном давлении. Остаток очищали на силикагеле (PhMe:EtOAc = 10:1). Получили 2.3 г (75%) белого твердого вещества.

ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 1.22–1.32 (м, 2H), 1.35 (3с, 9H, *t*-Bu), 1.43–1.60 (м, 4H), 2.58 (т, 2H,  $J = 7.4$  Гц), 2.42–2.50 (м, 2H), 3.85 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.87 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 7.04–7.11 (м, 3H), 7.50–7.61 (м, 2H), 7.66–7.74 (м, 2H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 24.4, 27.6, 27.7, 28.1, 28.7, 29.2, 34.6, 55.4, 55.7, 79.3, 110.1, 113.7, 129.6, 129.9, 130.0, 130.1, 131.0, 131.7, 160.4, 162.4, 172.2, 193.3.

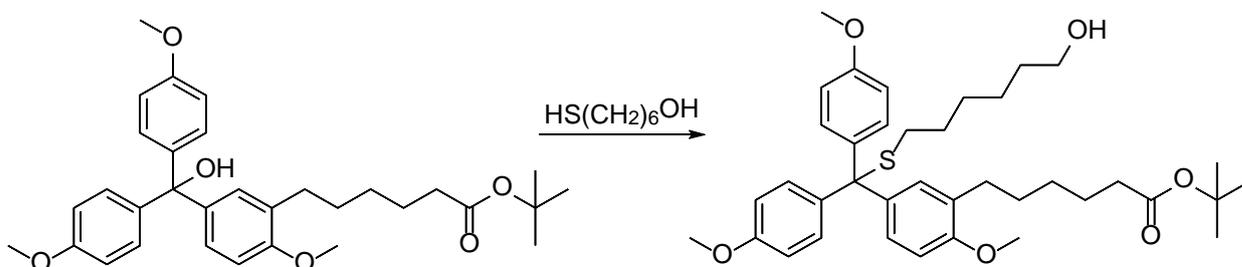


**4,4',4''-Триметокси-3-(5-*tert*-бутоксикарбонилпентил)гританол (2.6)** [202].

4-Анизилмагний бромид (1.25 М в ТГФ, 7 мл) растворили в абс. ТГФ (20 мл), затем при 0°C к этому раствору добавили по каплям раствор 4,4'-диметокси-3-(5-*tert*-бутилоксикарбонилпентил)бензофенона (1.64 г, 4 ммоль) в ТГФ (15 мл). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре к реакционной смеси добавили 10% водный раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 мл) и EtOAc (100 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  ( $2 \times 100$  мл), высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили при пониженном давлении. Полученный продукт был очищен методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе PhMe:EtOAc 5:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$  ( $R_f$  0.4). Получили 1.7 г (82%) светло-желтого масла.

ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 1.13–1.29 (м, 2H), 1.37 (с, 9H, *t*-Bu), 1.39–1.53 (м, 4H), 2.12 (т, 2H,  $J = 7.3$  Гц,  $\text{CH}_2$ ), 2.40–2.49 (м, 2H), 3.72 (с, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.74 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.02 (с, 1H,  $\text{OH}$ ), 6.77–6.92 (м, 6H), 6.95–7.02 (м, 1H), 7.03–7.12 (м, 4H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 24.4, 27.7, 28.0, 28.9, 29.5, 34.7, 54.9, 55.2, 79.2, 79.6, 109.3, 112.6, 126.3, 128.6, 128.8, 129.2, 140.0, 140.6, 155.5, 157.7, 172.2.

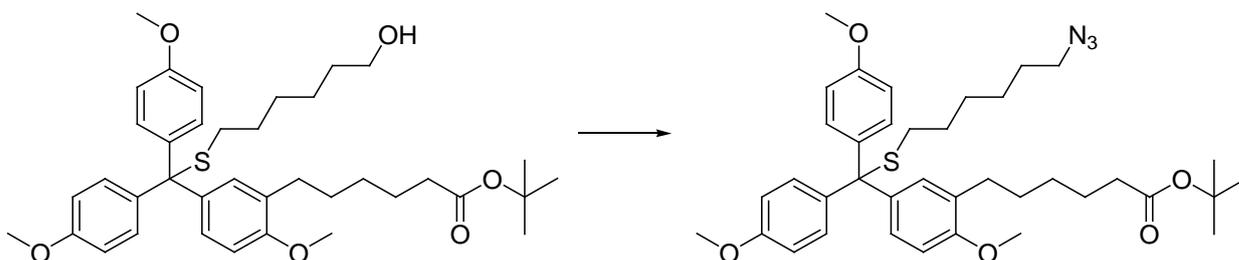


**6-[(3-(5-*трет*-Бутоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)-метилтио]гексанол (2.7).**

К раствору 4,4',4''-триметокси-3-(5-*трет*-бутоксикарбонилпентил)тританола (1.46 г; 2.8 ммоль) и 6-меркаптогексанола (413 мг, 3.1 ммоль) в сухом ДХМ (30 мл) при перемешивании добавили ледяную уксусную кислоту (3 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ). Затем к реакционной смеси добавили ДХМ (100 мл) и полученный раствор промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $3 \times 100$  мл), органический слой высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель удалили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе (PhMe:EtOAc, 10:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ). Получили 1.41 г (80%) желтого масла.  $R_f = 0.26$  (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ).

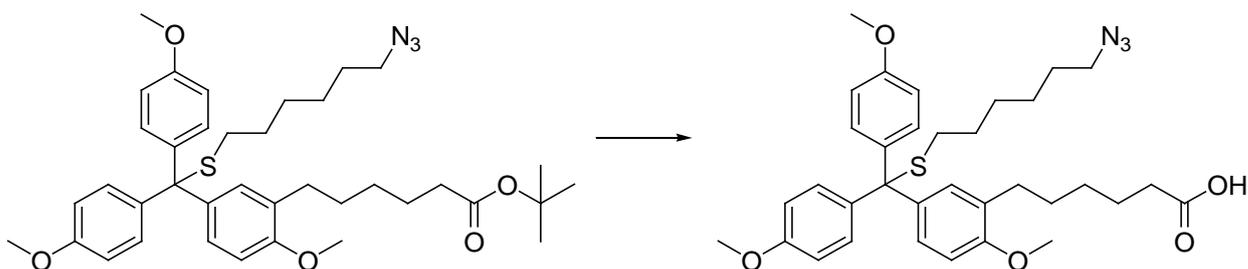
ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 1.06–1.23 (м, 6H), 1.24–1.34 (м, 4H), 1.35 (с, 9H, *t*-Bu), 1.39–1.48 (м, 4H), 2.01–2.15 (м, 4H), 2.41–2.49 (м, 2H), 3.28–3.35 (м, 2H), 3.73 (с, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.75 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.24–4.30 (м, 1H,  $\text{OH}$ ), 6.78–6.88 (м, 5H), 6.96–7.10 (м, 2H), 7.13–7.28 (м, 4H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 24.3, 25.0, 27.7, 27.9, 28.2, 28.3, 28.7, 29.4, 31.4, 32.2, 34.6, 54.9, 55.2, 60.5, 79.1, 79.2, 109.6, 113.0, 127.5, 128.8, 130.0, 130.5, 136.5, 137.3, 155.3, 157.4, 172.1.



**6-[(3-(5-*tert*-Бутоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)-метилтио]гексилазид (2.8).**

6-[(3-(5-*tert*-Бутоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексанол (1.30 г, 2.0 ммоль) при перемешивании растворили в сухом ДХМ (20 мл) и последовательно добавили метансульфохлорид (467 мг; 4.0 ммоль) и триэтиламин (263 мг; 2.6 ммоль). Ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). После завершения реакции (к реакционной смеси добавили ДХМ (80 мл) и промыли насыщенным водным раствором NaCl (2×100 мл) и водой (2×100 мл). Органический слой высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Полученный мезилат растворили в ДМСО (15 мл) и добавили NaN<sub>3</sub> (650 мг, 10.0 ммоль). Ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). После конверсии мезилата к реакционной смеси добавили EtOAc (100 мл) и промыли водой (4×75 мл). Органический слой высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе (PhMe:EtOAc, 15:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). Получили 1.1 г (90%) желтого масла. R<sub>f</sub> = 0.85 (PhMe:EtOAc, 10:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.09–1.34 (м, 8H), 1.37 (3с, 9H, *t*-Bu), 1.39–1.51 (м, 6H), 2.04–2.16 (м, 4H), 2.41–2.49 (м, 2H), 3.24 (т, 2H, *J* = 6.8 Гц), 3.73 (с, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.75 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.80–6.90 (м, 5H), 6.96–7.10 (м, 2H), 7.14–7.27 (м, 4H). ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 24.4, 25.6, 25.6, 27.2, 27.7, 27.8, 27.9, 27.9, 28.0, 28.3, 28.8, 29.4, 31.2, 34.6, 50.5, 54.9, 55.2, 79.2, 109.6, 113.0, 127.5, 128.9, 130.0, 130.5, 136.5, 137.3, 155.3, 157.5, 172.1



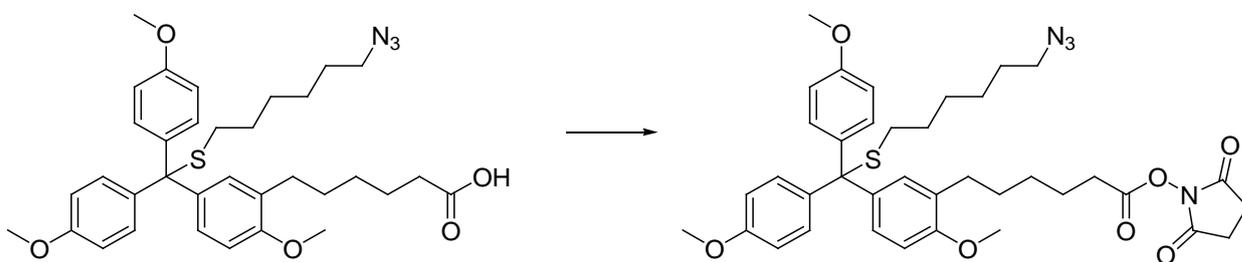
**6-[(3-(5-Карбоксипентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексилазид (2.9)**

К раствору 6-[(3-(5-*tert*-бутоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексилазида (1.1 г, 1.8 ммоль) в ДМСО (25 мл) при перемешивании добавили раствор тетрабутиламмоний гидроксида (40% аq., 20 мл). Ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). После конверсии

исходного реагента (исчезновения исходного соединения) к реакционной смеси добавили лимонную кислоту (примерно 10 мл насыщенного раствора), в результате образовалась белая эмульсия. Полученную эмульсию экстрагировали EtOAc (2×50 мл). Органический слой промыли водой (4×70 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и удалили растворитель при пониженном давлении. Получили 617 мг (90%) вязкого желтого масла. R<sub>f</sub> = 0.10 (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1% NEt<sub>3</sub>).

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.08–1.35 (м, 8H), 1.35–1.54 (м, 6H), 2.03–2.21 (м, 4H), 2.41–2.49 (м, 2H), 3.24 (т, 2H, *J* = 6.8 Гц), 3.72 (с, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.75 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.80–6.90 (м, 5H), 6.97–7.04 (м, H), 7.07 (д, 1H, *J* = 1.8 Гц), 7.14–7.23 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 24.3, 25.6, 27.9, 28.0, 28.0, 28.2, 28.9, 29.5, 31.3, 33.6, 50.5, 55.0, 55.2, 64.6, 109.6, 113.0, 127.6, 128.9, 130.1, 130.6, 136.5, 137.3, 155.4, 157.5, 174.4.

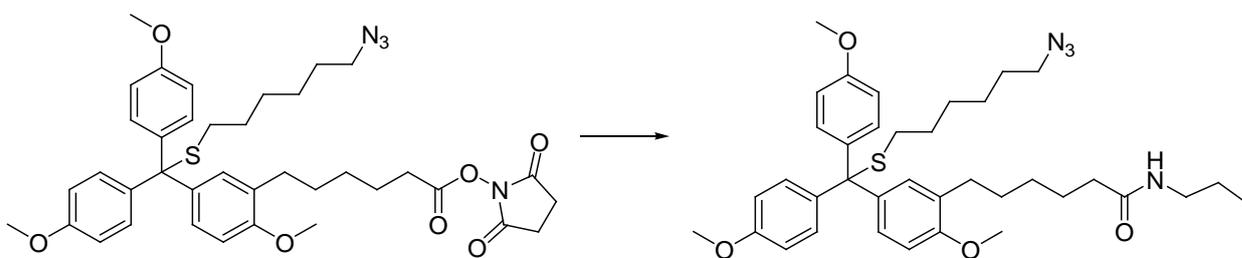


**6-[(3-(5-*N*-сукцинимидилоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексилазид (2.2).**

6-[(3-(5-Карбоксипентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексилазид (1.8 г, 2.9 ммоль) растворили в смеси ДХМ (50 мл) и ацетонитрила (10 мл), затем последовательно добавили дисукцинимидил карбонат (1.04 г, 4.06 ммоль) и NEt<sub>3</sub> (410 мг, 4.06 ммоль). Ход реакции контролировали методом ТСХ (1:1 PhMe:Me<sub>2</sub>CO + 1% Et<sub>3</sub>N). Реакционную смесь перемешивали 1 ч, после чего добавили ДХМ (50 мл) и промыли её насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×50 мл) и водой (3×100 мл). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (7:1 PhMe:EtOAc + 1% Et<sub>3</sub>N, R<sub>f</sub> 0.3). Получили 1.5 г (75%) бесцветного масла.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.05–1.21 (м, 4H), 1.21–1.35 (м, 4H), 1.37–1.52 (м, 4H), 1.53–1.68 (м, 2H), 2.09 (м, 2H), 2.48 (м, 2H), 2.61 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц), 2.80 (с, 4H, Su), 3.24 (т, 2H, *J* = 6.6 Гц), 3.72 (с, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.76 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.81–6.90 (м, 5H), 6.98–7.05 (м, 1H), 7.08 (м, 1H), 7.16–7.23 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 24.0, 25.4, 25.6, 27.6, 27.8, 28.0, 28.0, 28.7, 29.4, 30.1, 31.2, 50.5, 55.0, 55.2, 64.6, 109.6, 113.0, 127.6, 128.8, 130.1, 130.5, 136.6, 137.3, 155.4, 157.5, 168.8, 170.2.

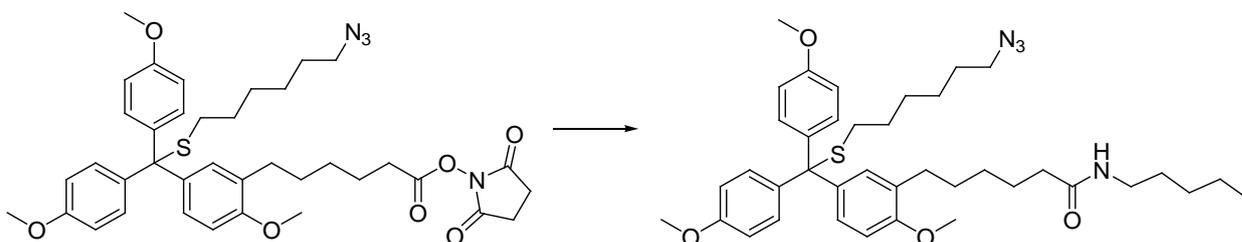


**6-[(3-(5-*N*-пропиламинокарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)-метилтио]гексилазид (2.10б).**

*n*-Пропиламин (48 мг, 0.8 ммоль) добавили к раствору 6-[(3-(5-*N*-оксисукцинимидилоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексилазида (185 мг, 0.26 ммоль) в ДХМ (5 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 ч к реакционной смеси добавили ДХМ (20 мл) и промыли насыщенным водным раствором лимонной кислоты. Органический слой промыли водой, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии (PhMe:EtOAc = 10:1). Получили 157 мг (92%) бесцветного масла. R<sub>f</sub> = 0.4 (PhMe:EtOAc, 5:2 + 1% NEt<sub>3</sub>).

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.81 (т, 3H, *J* = 7.3 Гц, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.05–1.55 (м, 16H), 1.92–2.15 (м, 4H), 2.39–2.48 (м, 2H), 2.89–3.03 (м, 2H), 3.24 (т, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 6.4 Гц), 3.73 (с, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.75 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.78–6.91 (м, 5H), 6.95–7.04 (м, H), 7.05–7.11 (м, 1H), 7.13–7.22 (м, 4H), 7.67 (уш. т., 1H, NH).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 11.3, 22.4, 25.2, 25.6, 27.8, 27.9, 28.0, 28.4, 29.0, 29.5, 31.2, 35.4, 50.5, 55.0, 55.2, 64.6, 109.6, 113.0, 127.5, 129.0, 130.0, 130.4, 136.5, 137.3, 155.3, 157.5, 171.8.



**6-[(3-(5-*N*-пентиламинокарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)-метилтио]гексилазид (2.10г)**

*n*-Амиламин (75 мг, 0.85 ммоль) добавили к раствору 6-[(3-(5-*N*-гидроксисукцинимидилоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)-метилтио]гексилазида (200 мг, 0.28 ммоль) в ДХМ (5 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 часов к реакционной смеси добавили ДХМ (20 мл) и промыли насыщенным водным раствором лимонной кислоты. Органический слой

промыли водой, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии ( $\text{PhMe}:\text{EtOAc}=10:1$ ). Получили 173 мг (90%) бесцветного масла.  $R_f = 0.4$  ( $\text{PhMe}:\text{EtOAc}, 5:2 + 1\% \text{NEt}_3$ ).

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 0.84 (т, 3H,  $J = 6.9$  Гц,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.07–1.52 (м, 20H), 1.99 (т,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.3$  Гц), 2.08 (д, 2H,  $J = 7.0$  Гц), 2.40–2.48 (м, 2H), 2.94–3.03 (м, 2H), 3.24 (т, 2H,  $J = 6.8$  Гц), 3.73 (с, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.75 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.81–6.92 (м, 5H), 6.96–7.04 (м, 1H), 7.05–7.10 (м, 1H), 7.15–7.26 (м, 4H), 7.67 (уш. т., 1H, NH).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 13.9, 21.8, 25.2, 25.6, 27.9, 28.0, 28.0, 28.4, 28.6, 28.8, 29.1, 29.6, 31.3, 35.4, 38.3, 50.5, 55.0, 55.2, 109.7, 113.0, 127.6, 128.2, 129.0, 130.1, 130.5, 136.5, 137.3, 155.4, 157.5, 171.7.

### Приготовление масс-меток для двоичного кодирования

6-[(3-(5-*N*-гидроксисукцинимидилоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)метилтио]гексилазид (**2.2**) (20 мг) растворили в ацетонитриле (1 мл). Затем раствор разделили на 8 равных частей и раскапали в 1.5 мл пластиковые пробирки, в каждую пробирку добавили по 2 мкл соответствующего амина (см. таблицу ниже). Каждую пробирку встряхивали в течении 30 мин и использовали дальше без дополнительной очистки.

---

Пробирка, № Амин

---

1	метиламин (40% водн. раствор)
2	<i>n</i> -пропиламин
3	<i>n</i> -бутиламин
4	<i>n</i> -пентиламин
5	<i>n</i> -гексиламин
6	<i>n</i> -гептиламин
7	<i>n</i> -октиламин
8	<i>n</i> -дециламин

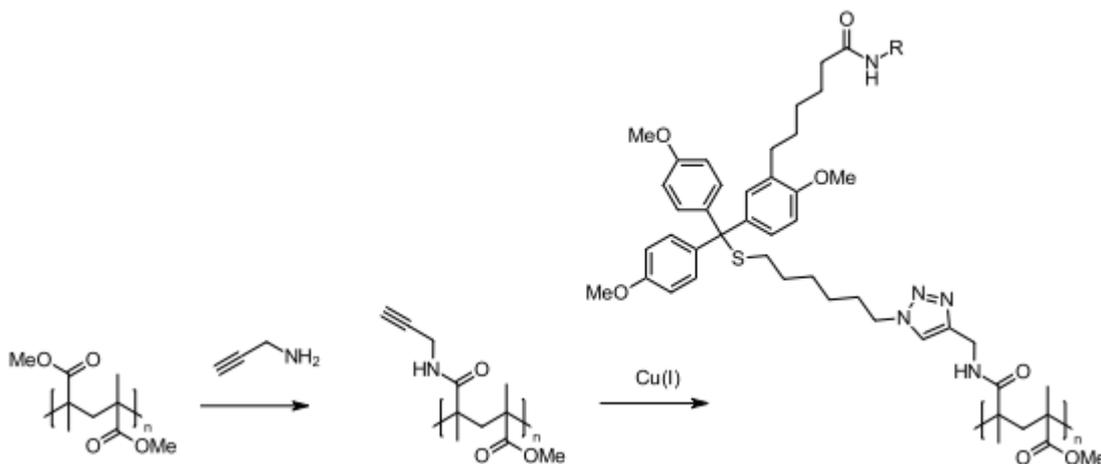
---

### Двоичное кодирование информации

Для кодирования использовали American Standard Code for Information Interchange (ASCII). Каждая позиция в коде задается одной масс-меткой. Значение 0 – это отсутствие сигнала

масс-метки, значение 1 – наличие сигнала. 10 мкл соответствующих растворов масс-меток смешали в пластиковых пробирках. Затем 0.5 мкл полученного раствора смешали с раствором 2,4,6-тригидроксиацетофенона (0.5 мкл, 40 мг/мл в MeOH) и водой (0.5 мл) и поместили в ячейку мишени масс-спектрометра, высушили и проанализировали методом MALDI-МС.

### Приготовление алкин-модифицированного ПММА [444]



Полиметилметакрилат (300 мг) растворили в хлороформе (20 мл). К 100 мкл полученного раствора последовательно добавили хлороформ (50 мл) и пропаргиламин (75 мкл), смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Отрицательный контроль проводили без добавления пропаргиламина.

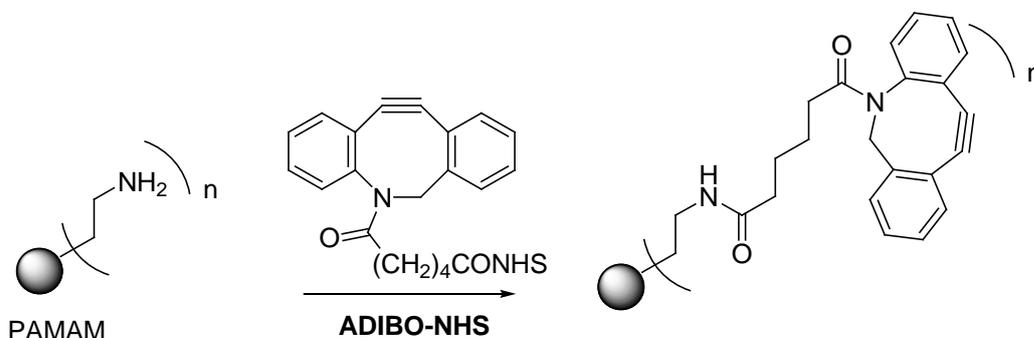
Полученный раствор алкинированного полимера нанесли на поверхность мишени масс-спектрометра (50 мкл раствора полимера на ячейку), высушили на воздухе в течение 30 минут и тщательно промыли ацетонитрилом.

### Иммобилизация масс-спектрометрических меток на алкин-модифицированной поверхности ПММА

Для приготовления раствора катализатора CuI (1.5 мг) и ТБТА (4.5 мг) поместили в MeCN (1 мл). Растворы масс-меток в ацетонитриле разбавили до концентрации  $10^{-5}$  М каждой масс-метки. Затем 100 мкл полученного раствора метки смешали с 10 мкл раствора катализатора и 5 мкл триэтиламина. После перемешивания и гомогенизации отобрали 20 мкл полученного раствора и нанесли в ячейку мишени масс-спектрометра, покрытую алкин-модифицированной поверхностью. Выдержали 10 мин, раствор удалили, поверхность ячейки тщательно промыли ацетонитрилом, высушили и проанализировали

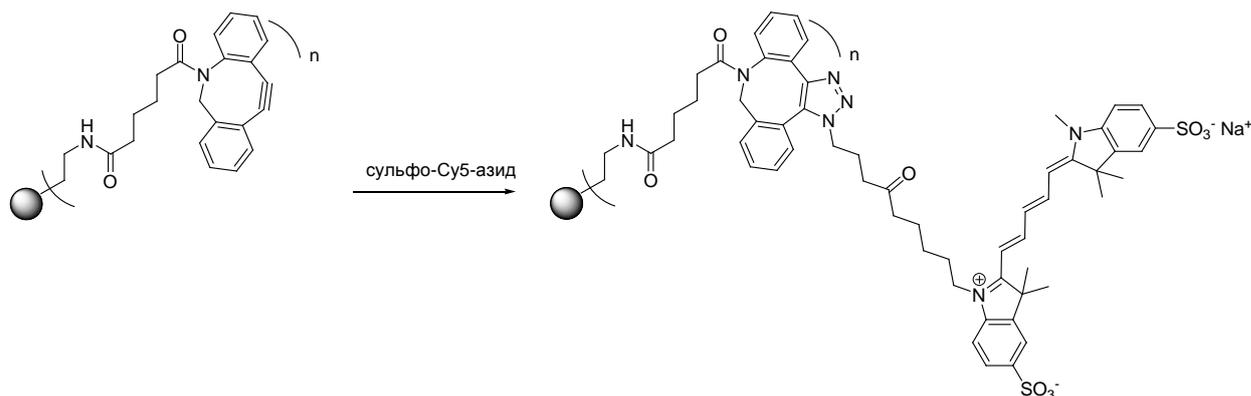
методом MALDI-МС. Отрицательный контроль проводили двумя способами: а) с алкин-модифицированной поверхностью и без катализатора; б) с немодифицированной поверхностью в присутствии катализатора.

### Приготовление циклооктин-модифицированного ПАМАМ-дендримера



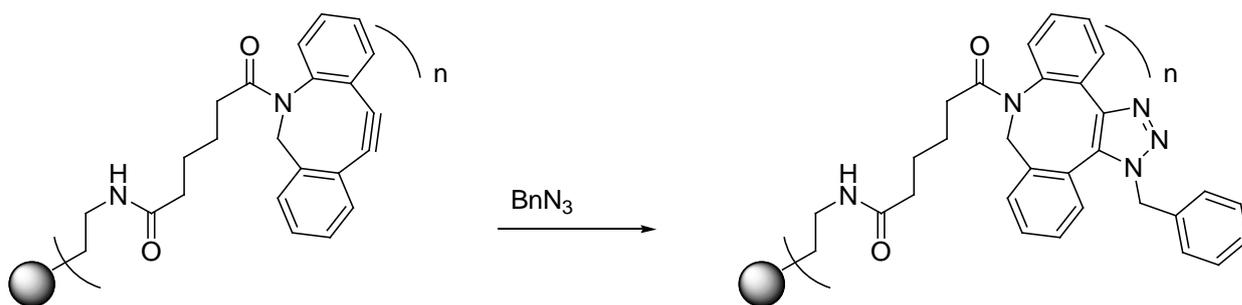
ADIBO-NHS (1 мг) растворили в ДХМ (150 мкл), к полученному раствору добавили ПАМАМ (3.5 мг 10%-раствора в метаноле). После 2 ч перемешивания при комнатной температуре к реакционной смеси добавили  $\text{Me}_2\text{CO}$  (1.5 мл), встряхнули, выпавший осадок отделили центрифугированием (2 мин; 10000 об/мин).

### Модификация циклооктин-модифицированного ПАМАМ-дендримера флуоресцентным красителем



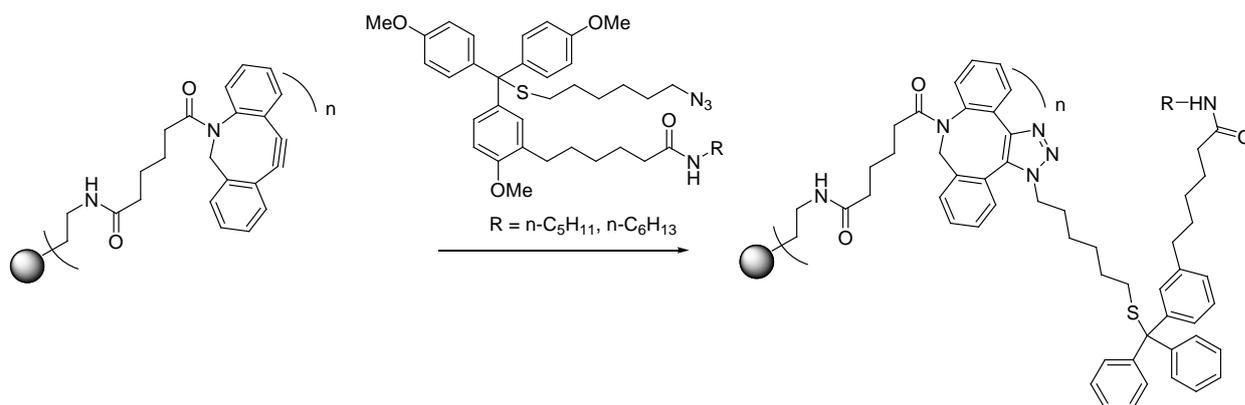
Циклооктин-модифицированный ПАМАМ-дендример растворили в ДХМ (200 мкл) и добавили раствор флуоресцентного красителя сульфо-Cy5 в ДМСО (250 мкл, 10мМ). После перемешивания в течение 2 ч при комнатной температуре к реакционной смеси добавили  $\text{Me}_2\text{CO}$  (1.5 мл), встряхнули, выпавший осадок отделили центрифугированием (2 мин; 10000 об/мин). Процедуру повторили 3 раза.

### Кепирование циклооктин-модифицированного РАМАМ-дендримера бензилазидом

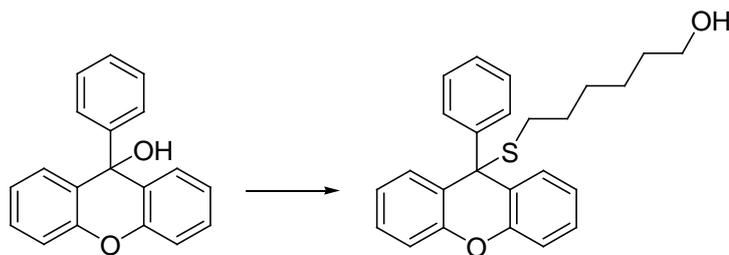


Циклооктин-модифицированный РАМАМ-дендример растворили в ДХМ (200 мкл) и добавили бензилазид (1 мг). После перемешивания в течение 2 ч при комнатной температуре к реакционной смеси добавили  $\text{Me}_2\text{CO}$  (1.5 мл), встряхнули, выпавший осадок отделили центрифугированием (2 мин; 10000 об/мин).

### Модификация циклооктин-модифицированного РАМАМ-дендримера масс-спектрометрическими метками



6-[(3-(5-*N*-сукцинимидилоксикарбонилпентил)-4-метоксифенил)-бис-(4-метоксифенил)-метилтио]гексилазид (1 мг) растворили в ДХМ (200 мкл), раствор разделили на две равные части в две пластиковые пробирки. В одну из них добавили 1 мкл *n*-пентиламина, во вторую - 1 мкл *n*-гексиламина и выдержали в течение 2 ч при комнатной температуре. Содержимое обеих пробирок добавили к растворам циклооктин-модифицированного РАМАМ-дендримера в ДХМ (200 мкл), реакционные смеси выдержали 3 ч при комнатной температуре при перемешивании, затем добавили к ним  $\text{Me}_2\text{CO}$  (1.5 мл), встряхнули, выпавшие осадки отделили центрифугированием (2 мин; 10000 об/мин). Процедуру повторили 3 раза. Высаженное вещество анализировали методом MALDI-МС (матрица – синапиновая кислота).

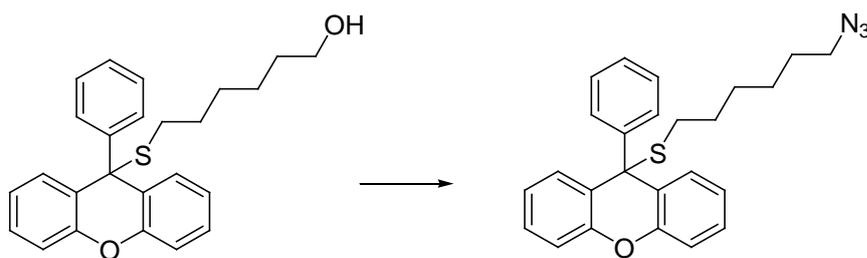


### 6-[S-(9-фенилтиоксантил)]гексанол (2.16)

9-Фенил-9H-ксантен-9-ол (700 мг, 2.55 ммоль) и 6-меркаптогексанол (376 мг, 2.8 ммоль) смешали в ДХМ (15 мл), к реакционной смеси добавили уксусную кислоту (3 мл). Ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc 6:1, + 1% NEt<sub>3</sub>, R<sub>f</sub> 0.35). (После полной конверсии исходного субстрата) По окончании реакции к реакционной смеси добавили ДМХ (50 мл) и промыли водой (2×50 мл). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (PhMe:EtOAc, 20:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). Получили 950 мг (95%) бесцветного масла.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.94-1.35 (м, 8H), 2.09 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц, SCH<sub>2</sub>), 3.27 (тд, 2H, *J* = 6.6, 5.1 Гц CH<sub>2</sub>OH), 4.25 (т, 1H, *J* = 5.1 Гц, -OH), 7.04 (м, 2H), 7.14 (м, 4H), 7.20–7.31 (м, 3H), 7.31–7.48 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 24.79, 27.74, 28.09, 29.76, 32.15, 54.71, 60.48, 115.76, 123.42, 125.32, 126.96, 128.25 (2C), 128.56, 130.11, 145.91, 150.11.



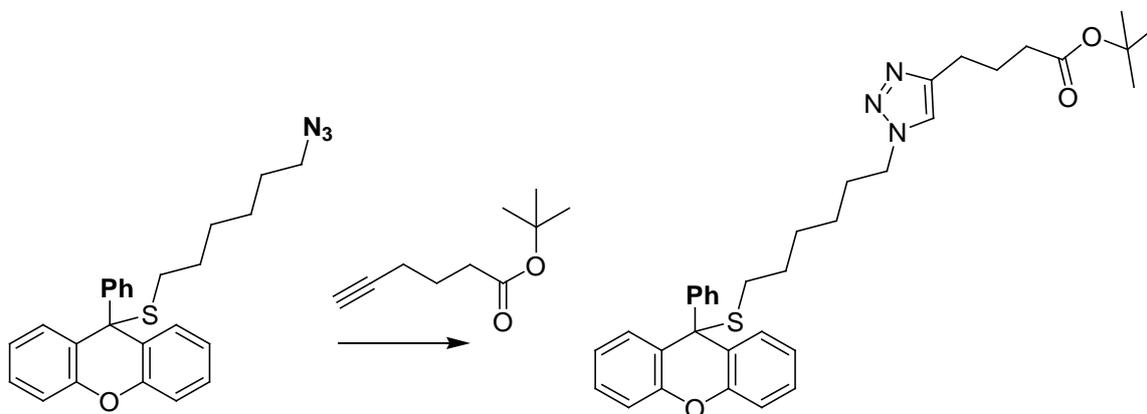
### 6-[S-(9-фенилтиоксантил)]гексилазид (2.17).

6-[S-(9-фенилтиоксантил)]гексанол (950 мг, 2.4 ммоль) при перемешивании растворили в сухом ДХМ (20 мл) и последовательно добавили метансульфохлорид (560 мг; 4.8 ммоль) и триэтиламин (505 мг; 5 ммоль). Ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc, 7:1 + 1% NEt<sub>3</sub>, R<sub>f</sub> 0.6). По окончании реакции к реакционной смеси добавили ДХМ (80 мл) и промыли насыщенным водным раствором NaCl (2×100 мл) и водой (2×100 мл). Органический слой высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и удалили растворитель. Полученный мезилат растворили в ДМСО (30 мл) и добавили NaN<sub>3</sub> (700 мг,

10.7 ммоль). Ход реакции контролировали методом ТСХ (PhMe:EtOAc, 10:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). По окончании реакции к реакционной смеси добавили EtOAc (100 мл) и промыли водой (4×100 мл). Органический слой высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе (PhMe + 1% NEt<sub>3</sub>). Получили 768 мг (77%) желтого масла.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.97-1.25 (м, 6H), 1.25–1.43 (м, 2H), 2.09 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц, SCH<sub>2</sub>), 3.20 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 7.04 (м, 2H), 7.14 (м, 4H), 7.20–7.31 (м, 3H), 7.31–7.46 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 25.36, 27.52, 27.59, 27.85, 29.64, 50.40, 54.72, 115.79, 123.45, 125.31, 126.99, 128.27 (2C), 128.59, 130.16, 145.94, 150.11.

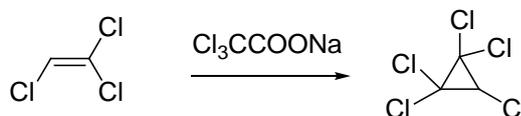


**1-(6-[S-(9-фенилтиоксантил)гексил]-4-(трет-бутилоксикарбонилпентил)-1H-1,2,3-триазол (2.18).**

Катализатор приготовили путем смешивания CuI (4.4 мг) и ТБТА (13.4 мг) в ДМФА (1 мл). 6-[S-(Пиксил)метилтио]гексилазид (95 мг, 0.23 ммоль) растворили в ДМФА (1 мл), добавили к полученному раствору трет-бутиловый эфир гекс-5-иновой кислоты (60 мг, 0.345 ммоль), диизопропилэтиламин (50 мкл) и раствор катализатора в ДМФА (1 мл). Реакцию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем добавили EtOAc (50 мл) и воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли водой (50 мл), насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 50:1). Получили 87 мг (65%) бесцветного масла.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.95 (м, 2H), 1.11 (м, 4H), 1.37 (с, 9H, *t*-Bu), 1.61 (м, 2H), 1.79 (м, 2H), 2.07 (м, 2H), 2.21 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц), 2.59 (м, 2H), 7.02 (м, 2H), 7.13 (д, 4H, *J* = 8.8 Гц), 7.24 (т, 3H, *J* = 6.6 Гц), 7.33 (м, 2H), 7.40 (м, 2H), 7.77 (с, 1H, *H*<sub>триазол</sub>).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 24.25, 24.45, 25.14, 27.49 (2C), 27.69 (2C), 29.35, 29.67, 34.08, 48.92, 54.72, 115.76, 121.60, 123.32, 126.96, 128.24 (2C), 128.55, 130.13, 145.91, 145.97, 150.11, 171.91.

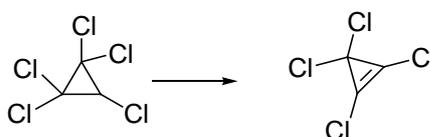


**Пентахлорциклопропан (2.19)** [459, 473].

Суспензию трихлорацетата натрия (187 г, 1 моль) в трихлорэтилене (300 мл) при перемешивании медленно нагрели до кипения и кипятили в течение 3 ч. Затем, к реакционной смеси добавили 1,2-диметоксиэтан (100 мл). Смесь перемешивали при осторожном кипении (92–94°C) в течение 5 суток. Наблюдали выделение  $\text{CO}_2$  в течение этого периода. Затем реакционную смесь отфильтровали, избыток растворителя упарили при 150 мм.рт.ст. и 40°C. Остаток перегнали в вакууме; т.кип. 75°C/20 мм.рт.ст. (лит. т. кип. 55.5–56.0°C/7 мм.рт.ст. [459]). Получили 45.2 г (21%) бесцветной жидкости.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.92 (с, 1H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 51.83, 66.57.

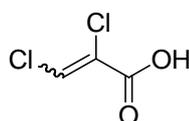


**Тетрахлорциклопропен (2.20)** [459, 473].

Пентахлорциклопропан (22.5 г, 0.1 моль) добавили к раствору  $\text{KOH}$  (15.3 г, 0.27 моль) в  $\text{H}_2\text{O}$  (18 мл). Образовавшуюся двухфазную смесь перемешивали и медленно нагрели до 75°C. При этой температуре начинается спонтанная экзотермическая реакция. В течение 30 мин поддерживали температуру в интервале 85–95°C. (При необходимости использовали охлаждающую баню для контроля температуры). Затем реакционную смесь охладили и добавили конц.  $\text{HCl}$  (11.5 мл), перемешали и добавили ДХМ (40 мл). Органический слой отделили, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили половину объёма растворителя при 150 мм.рт.ст. и 40°C. Остаток перегнали при пониженном давлении. Получили 10.8 г (61%) бесцветной жидкости (т. кип. 43°C/100 мбар).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 62.42, 122.69.

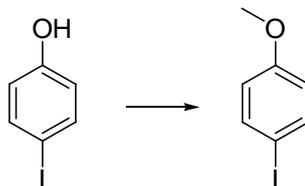
При превышении температурного режима даже на 5°C, количественно образуется 2,3-дихлорпропеновая кислота (**2.21**) [460]; т. пл. 86°C (лит. т. пл. 83–84°C [474]).



ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.80 (с, 1H), 11.71 (с, 1H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 126.81, 135.27, 166.11.

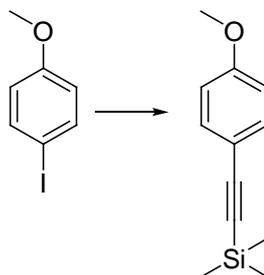
Масс-спектр:  $m/z$  ( $I$ , %): 140 (49%), 123 (15%), 105 (100%), 95 (35%), 60 (77%).



#### 4-Иодоанизол [445].

4-Иодфенол (10 г, 45 ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (12.5 г, 91 ммоль) и метил иодид (13 г, 91 ммоль) растворили в ацетоне (100 мл) при комнатной температуре. После перемешивания реакционной смеси в течение 1 дня растворитель упарили при пониженном давлении и к остатку добавили ДХМ (150 мл), промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл). Органический слой высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили при пониженном давлении. Получили 9.9 г (94%) твердого продукта; т. пл. 51–53°C (лит. т. пл. 50–52°C [237]).

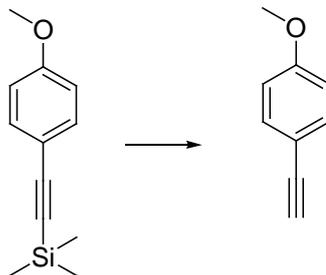
ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.77 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.68 (д, 2H,  $J = 8.8$  Гц), 7.55 (д, 2H,  $J = 8.8$  Гц).



#### (4-Метоксифенил)этинилтриметилсилан [446].

4-Иодоанизол (3.00 г, 10.8 ммоль), триметилсилилацетилен (1.9 г, 19.2 ммоль),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (3 моль%, 111 мг) и  $\text{CuI}$  (6 моль%, 60 мг) последовательно добавили к  $\text{Et}_3\text{N}$  (40 мл). Через реакционную смесь в течение 5 мин пропускали ток аргона и оставили перемешиваться на 10 ч в инертной атмосфере. Ход реакции контролировали методом ТСХ ( $\text{CHCl}_3$ : $n$ - $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , 1:3), после завершения реакции растворитель удалили при пониженном давлении. Остаток растворили в  $\text{CHCl}_3$  (100 мл) и добавили воду (100 мл). Органический слой отделили и последовательно промыли раствором  $\text{HCl}$  (10% водн., 100 мл) и насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ , после чего высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили. Полученный продукт очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле ( $\text{CHCl}_3$ : $n$ - $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , 1:3). Получили 2.4 г (92%) коричневого масла.

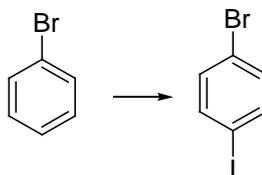
ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.26 (с, 9H,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.81 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.83 (д, 2H,  $J = 8.8$  Гц), 7.42 (д, 2H,  $J = 8.8$  Гц).



#### 1-Этинил-4-метоксибензол [446].

Смесь (4-метоксифенил)этинилтриметилсилана (1.39 г, 6.8 ммоль) и  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.7 г, 34 ммоль) в ТГФ (20 мл) и MeOH (20 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1.5 ч. Растворители упарили и полученный остаток растворили в EtOAc (100 мл), промыли водой (100 мл) и высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель удалили и получили 810 мг (89%) продукта. Вещество использовали без дальнейшей очистки.

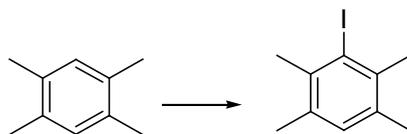
ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.99 (с, 1H,  $\equiv\text{CH}$ ), 3.80 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.83 (д, 2H,  $J = 8.1$  Гц), 7.42 (д, 2H,  $J = 8.1$  Гц).



#### 4-Бром-1-иодбензол [447].

Бромбензол (5 г, 31.8 ммоль) добавили к смеси  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50% водн., 4.4 мл) и уксусной кислоты (22 мл). К полученной смеси при перемешивании при комнатной температуре последовательно добавили измельченный  $\text{I}_2$  (3 г, 11.8 ммоль) и измельченный  $\text{NaIO}_4$  (1.2 г, 5.6 ммоль). Никаких изменений температуры не наблюдалось. Затем при интенсивном перемешивании реакционную смесь нагрели до  $90^\circ\text{C}$ . Через три часа цвет реакционной смеси меняется от темно-фиолетового до оранжевого и выпадает белый осадок. После охлаждения до комнатной температуры продукт выпадает в виде белых кристаллов. В колбу добавляли ДХМ (100 мл) и воду (100 мл), органический слой отделяли и последовательно промывали насыщенным водным раствором  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (100 мл) и насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$  (100 мл). Органический слой высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили при пониженном давлении, высушили на воздухе. Получили 5.2 г (58%) светло-желтого кристаллического вещества; т. пл.  $89\text{--}91^\circ\text{C}$  (лит. т. пл.  $91\text{--}92^\circ\text{C}$  [238]).

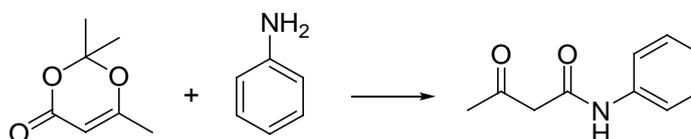
ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.23 (д, 2H,  $J = 8.8$  Гц), 7.55 (д, 2H,  $J = 8.1$  Гц).



### 3-Иод-1,2,4,5-тетраметилбензол [452].

В трехгорлую колбу, снабженную обратным холодильником, термометром, и магнитной мешалкой поместили дурол (3 г, 22 ммоль),  $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.03 г, 4.46 ммоль) и иод (2.3 г, 9 ммоль). К этой смеси добавили смесь конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 мл), воды (5 мл) в уксусной кислоты (23 мл). Полученную реакционную смесь нагрели до  $65\text{--}70^\circ\text{C}$  при перемешивании и приблизительно через 1 ч характерная окраска иода исчезла. К смеси добавили воду (250 мл), выпали светло-желтые кристаллы, их отфильтровали и промыли водой ( $3 \times 100$  мл). Продукт растворили в минимальном объеме кипящего ацетона (приб. 25 мл), раствор охладили до комнатной температуры и поставили на ночь в морозильную камеру, на следующий день быстро отфильтровали. Получили 5.2 г (78%) бесцветных кристаллов; т. пл.  $78\text{--}80^\circ\text{C}$  (лит. т. пл.  $78^\circ\text{C}$  [239]).

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.31 (с, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 2.44 (с, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 6.89 (с, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ).

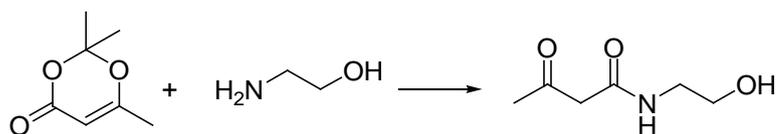


### Ацетоацетанилид (2.41) [461].

Анилин (32 г, 0.345 ммоль) и 2,2,6-триметил-4H-1,3-диоксин-4-он (60 г, 0.414 моль) растворили в абс. ТГФ (200 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 24 ч. Растворитель упарили при пониженном давлении, продукт перекристаллизовали из толуола (100 мл), осадок отфильтровали, промыли холодным толуолом ( $2 \times 20$  мл), диэтиловым эфиром ( $2 \times 50$  мл) и высушили на воздухе. Получили 52 г (85%) белого кристаллического вещества; т. пл.  $84\text{--}86^\circ\text{C}$  (лит. т. пл.  $84\text{--}85^\circ\text{C}$  [240]).

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.28 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 3.55 (с, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.09 (т, 1H,  $J = 7.3$  Гц,  $\text{CH}_{\text{Ar-пара}}$ ), 7.29 (т, 2H,  $J = 7.8$  Гц,  $\text{CH}_{\text{Ar-мета}}$ ), 7.52 (д, 2H,  $J = 7.8$  Гц,  $\text{CH}_{\text{Ar-орто}}$ ), 9.16 (с, 1H, NH).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 31.06, 49.88, 120.12, 124.51, 128.89, 137.42, 163.69, 204.99.

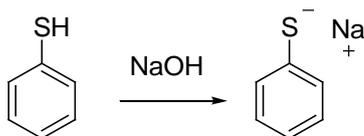


### **N-(2-гидроксиэтил)ацетоацетамид (2.42).**

Этаноламин (331 мг, 5.4 ммоль), 2,2,6-триметил-4*H*-1,3-диоксин-4-он (1000 мг, 7 ммоль) и ацетат натрия (444 мг, 5.4 ммоль) смешали в абс. ТГФ (15 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 24 ч. Растворитель удалили, к остатку добавили EtOAc (50 мл) и воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором NaCl, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 15:1). Получили 410 мг (52%) желтого масла.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.12 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3.13 (м, 2H), 3.28 (с, 2H, -C(O)CH<sub>2</sub>C(O)-), 3.40 (м, 2H), 4.62 (уш. с, 1H, OH), 7.99 (уш. с, 1H, NH).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 29.86, 41.52, 51.18, 59.68, 166.07, 203.03.



### **Тиофенолят натрия (2.51).**

NaOH (1 г, 27 ммоль) растворили в смеси EtOH (20 мл) и воды (20 мл), затем к полученному раствору добавили тиофенол (3.3 г, 30 ммоль). После перемешивания в течение часа реакционную смесь упарили и затерли с диэтиловым эфиром (50 мл). Выпавший осадок отфильтровали, промыли диэтиловым эфиром (100 мл) и высушили на масляном насосе. Получили 3.5 г (100%) белого кристаллического вещества; т. пл. > 320°C).

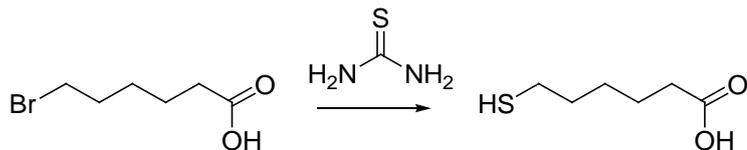
ЯМР <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O): 6.97 (м, 1H), 7.10 (м, 2H), 7.37 (м, 2H).



### **Этоксиксантат калия (2.53) [462].**

KOH (2 г, 36 ммоль) растворили в EtOH (30 мл), раствор охладили до 0°C и затем добавили дисульфид углерода (3.25 г, 43 ммоль) одной порцией при 0°C. Моментально образовался желтый осадок. Реакционную смесь 3 ч перемешивали при комнатной температуре, затем растворитель упарили, а остаток затерли с диэтиловым эфиром (30 мл), отфильтровали, промыли диэтиловым эфиром (50 мл) и высушили на масляном насосе. Получили 5.2 г (90%) желтого кристаллического вещества; т. пл. 220°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 1.35 (т, 3H,  $J = 7.14$  Гц), 4.48 (квадр, 2H,  $J = 7.0$  Гц).

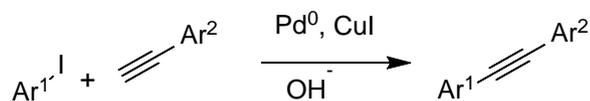


### 6-Меркаптогексановая кислота (2.55) [463].

6-Бромгексановую кислоту (25 г, 128 ммоль) и тиомочевину (10.8 г, 140 ммоль) растворили в EtOH (40 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Затем к реакционной смеси добавили водный раствор NaOH (4 М, 320 ммоль, 80 мл) и продолжили кипятить реакционную смесь ещё 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь подкислили водным раствором HCl (6 М, 55 мл) и экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  ( $2 \times 100$  мл). Объединенные органические слои высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровали, растворитель упарили, остаток перегнали в вакууме; т. кип.  $104^\circ\text{C}/0.5$  торр (лит. т. кип.  $112\text{--}116/0.8$  торр [483]). Получили 14.5 г (76%) бесцветной жидкости.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 1.25–1.41 (м, 2H), 1.41–1.60 (м, 4H), 2.10–2.26 (м, 3H,  $\text{SH} + \text{CH}_2$ ), 2.36–2.49 (м, 2H), 11.97 (с, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 23.66, 23.98, 27.31, 33.11, 33.58, 174.40.



### Общая методика синтеза диарилацетиленов.

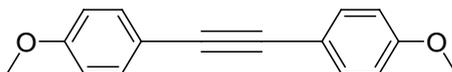
Арилиодид (1.05 экв), арилацетилен (1 экв),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (5 мол %) и CuI (10 мол %) смешивали в  $\text{Et}_2\text{NH}$ . Через полученный раствор в течение 5 мин пропускали ток аргона, а затем оставляли перемешиваться в течение 10 ч в инертной атмосфере при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ ( $\text{PhMe}:\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{14}$ ). После завершения реакции растворитель упаривали, к остатку добавляли EtOAc и воду, органический слой промывали последовательно насыщенным водным раствором  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ЭДТА}$  и насыщенным водным раствором соли. Органический слой высушивали на  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали и остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле.



**4-Метокситолан (2.23) [448].**

Выход 91% (желтое кристаллическое вещество), система для хроматографирования (PhMe: *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 1:5); т. пл. 62°C (лит. т. пл. 60–62°C [479]).

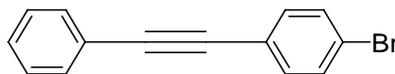
ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 3.82 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.88 (д, 2H, *J* = 8.8 Гц), 7.26-7.40 (м, 3H), 7.41-7.63 (м, 4H).

**4,4'-Диметокситолан (2.24) [449].**

Выход 61% (желтое кристаллическое вещество), система для хроматографирования (PhMe: *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 1:3); т. пл. 146–147°C (лит. т. пл. 145–147°C [480]).

ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 3.81 (с, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 6.86 (д, 4H, *J* = 8.1 Гц), 7.45 (д, 4H, *J* = 8.1 Гц).

ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 55.26, 87.93, 113.95, 115.71, 132.85, 159.37.

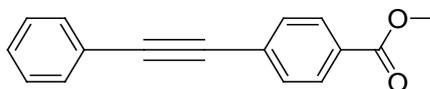
**4-Бромтолан (2.26) [450].**

Выход 77% (желтое кристаллическое вещество), система для хроматографирования (PhMe: *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 1:10); т. пл. 83–85°C (лит. т. пл. 83–84°C [481]).

ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 7.28–7.44 (м, 5H), 7.44–7.63 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 88.28, 90.49, 122.24, 122.45, 122.90, 128.38, 128.48, 131.57 (2C), 132.99.

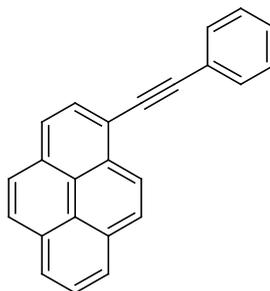
Масс-спектр: *m/z* (*I*, %): 258 (100%), 256 (95%), 176 (23%), 88 (13%).

**Метилловый эфир 4-(фенилэтинил)бензой кислоты (2.27) [464].**

Выход 68% (светло-коричневое кристаллическое вещество), система для хроматографирования (PhMe: *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 1:8). Помимо колоночной хроматографии продукт очищали, растворив в смеси PhMe: *n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 1:10, нерастворимые примеси отфильтровали, фильтрат упарили и остаток перекристаллизовали из минимального количества метанола.

ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 3.92 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7.35 (м, 3H), 7.64 (м, 2H), 7.58 (д, 2H, *J* = 8.6 Гц), 8.01 (д, 2H, *J* = 8.6 Гц).

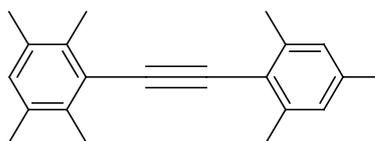
ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 52.17, 88.60, 92.32, 122.67, 127.97, 128.40, 128.72, 129.44, 129.48, 131.46, 131.70, 166.50.



**1-Фенилэтинилпирен (2.29)** [451].

Выход 72% (желтый порошок), система для хроматографии ( $n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{CHCl}_3$ , 5:1); т. пл. 122–124°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 7.44–7.53 (м, 3H), 7.77 (м, 2H), 8.10 (т, 1H,  $J = 7.6$  Гц), 8.16–8.30 (м, 4H), 8.31–8.38 (м, 3H), 8.60 (д, 1H,  $J = 9.1$  Гц).



**3-(Мезитилэтинил)-1,2,4,5-тетраметилбензол (2.28).**

Выход 83% (светло-желтое кристаллическое вещество), система для хроматофирования ( $\text{PhMe}: n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ , 1:5).

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.29 (м, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2.49 (м, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 6.88 (с, 1H,  $\text{CH}_{\text{пара}}$ ), 6.93 (с, 2H,  $2\text{CH}_{\text{мета}}$ ).



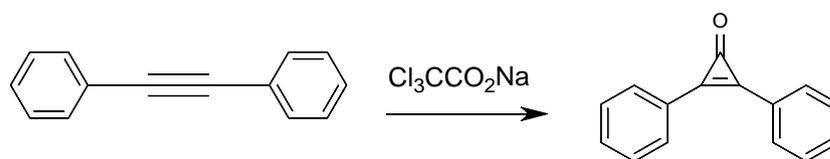
**4-Иодтолан (2.25)** [465].

Выход 65% (белый порошок), система для хроматофирования ( $\text{PhMe}: n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ , 1:100).

Примечание: для реакции брали избыток 1,4-дииодбензола (2.5 экв); т. пл. 108–109°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.29 (д, 2H,  $J = 8.1$  Гц), 7.39 (с, 3H), 7.56 (м, 2H), 7.73 (д, 2H,  $J = 8.1$  Гц).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 88.44, 90.80, 94.07, 122.83, 122.93, 128.38, 128.50, 131.59, 133.07, 137.52.

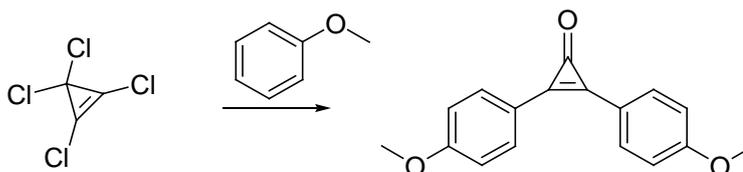


**Дифенилциклопропенон (2.30)** [466].

Толан (1 г, 5.61 ммоль) и трихлорацетат натрия (5.2 г, 27 ммоль) смешали в 1,2-диметоксиэтано (30 мл) и кипятили в течение 20 ч при перемешивании. Затем к смеси добавили воду (200 мл) и проэкстрагировали EtOAc (200 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором NaCl (200 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (PhMe). Получили 130 мг (11%) белого кристаллического вещества; т. пл. 119–120°C (лит. т. пл. 120°C [482]).

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 7.69 (м, 6H), 7.98 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 123.43, 128.71, 129.70, 131.24, 132.96, 148.13.

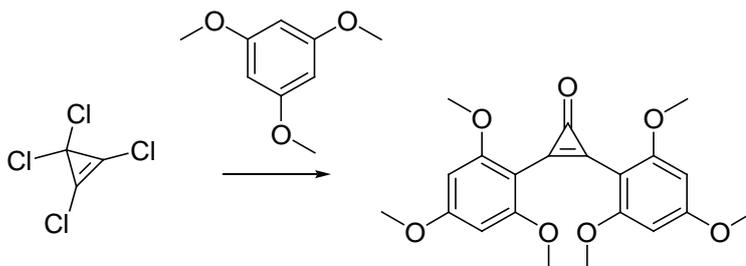


**2,3-Бис-(4-метоксифенил)циклопропенон (2.31)** [467].

Раствор анизоло (1214 мг, 11.24 ммоль) в ДХМ (5мл) при перемешивании по каплям прибавляли к смеси AlCl<sub>3</sub> (864 мг, 6.47 ммоль) и тетрахлорциклопропена (1 г, 5.62 ммоль) в ДХМ (20 мл) при -70°C. После перемешивания в течение 2 ч при -70°C охлаждение убрали, реакционная смесь нагрелась до комнатной температуры и продолжили перемешивание ещё в течение ночи. Затем в реакционную смесь добавили воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (PhMe:EtOAc, 5:1). Получили 478 мг (32%) белого кристаллического вещества; т. пл. 176–178°C (лит. т. пл. 180°C [482]).

ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 3.88 (с, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 7.03 (д, 4H, *J* = 8.8 Гц), 7.88 (д, 4H, *J* = 8.8 Гц).

ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 55.51, 114.70, 117.10, 133.42, 144.11, 155.26, 162.69.

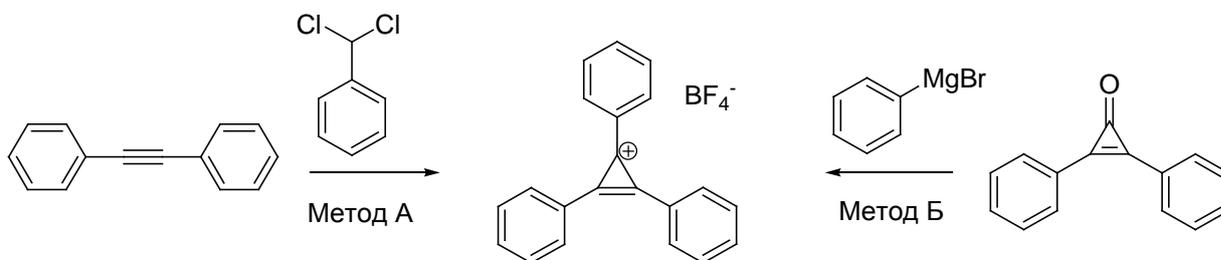


### 2,3-Бис-(2,4,6-триметоксифенил)циклопропенон (2.32).

Раствор 1,3,5-триметоксибензола (1.89 г, 11.25 ммоль) в ДХМ (5 мл) при перемешивании по каплям прибавляли к смеси  $\text{AlCl}_3$  (900 мг, 6.47 ммоль) и тетрахлорциклопропена (1 г, 5.62 ммоль) в ДХМ (20 мл) при  $-70^\circ\text{C}$ . После перемешивания в течение 2 ч при  $-70^\circ\text{C}$  охлаждение убрали, реакционная смесь нагрелась до комнатной температуры и продолжили перемешивание ещё в течение ночи. Затем в реакционную смесь добавили воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$  (50 мл), высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и удалили растворитель при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле ( $\text{PhMe}:\text{EtOAc}$ , 6:1). Получили 1216 мг (56%) белого кристаллического вещества; т. пл.  $189\text{--}191^\circ\text{C}$ .

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.77 (3с, 12H), 3.87 (с, 6H), 6.10 (4с, 4H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 55.34, 55.64, 89.77, 99.81, 141.30, 155.54, 161.13, 164.34.



### Трифенилциклопропенилий тетрафторборат (2.33) [363, 369, 453].

**Метод А:** В 100-мл колбу поместили толан (1.5 г, 8.41 ммоль) и *трет*-бутилат калия (3.8 г, 33.64 ммоль) в сухом бензоле (50 мл). Через смесь при перемешивании пропускали ток аргона в течение 5 мин, затем смесь оставили интенсивно перемешиваться в атмосфере аргона. Через резиновую септу добавили бензилиден хлорид (2.7 г, 16.82 ммоль), нагрели реакционную смесь до кипения и кипятили в течение 6 ч. Затем реакционную смесь охладили до комнатной температуры, добавили воду (100 мл), органический слой отделили, а водный экстрагировали толуолом ( $2 \times 50$  мл). Органические слои объединили, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отфильтровали. Фильтрат подкислили  $\text{HBF}_4$

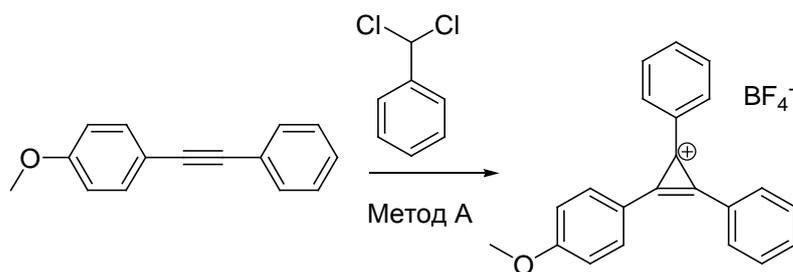
(4 экв. 50% водн. раствора), до окончания образования светло-желтого осадка. Осадок отфильтровали и высушили на масляном насосе. Получили 1.787 г (60%) светло-желтого кристаллического вещества; т. пл. 203–205°C.

**Метод Б:** К раствору PhMgBr (6 мл, 1М в ТГФ) в 20 мл Et<sub>2</sub>O при 0°C добавили твердый дифенилциклопропенон (400 мг, 1.94 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при 0°C к реакционной смеси добавили 10 мл 10%-водн. раствора KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>. Органический слой отделили, водный слой промыли Et<sub>2</sub>O (20 мл) и объединенные органические слои высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем отфильтровали и подкислили HBF<sub>4</sub> (4 экв. 50% водн. раствора) до окончания образования светло-желтого осадка. Осадок отфильтровали и высушили на масляном насосе. Получили 480 мг (70%) светло-желтого кристаллического вещества.

ЯМР <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN): 7.93 (т, 6H, *J* = 7.7 Гц, CH<sub>мета</sub>), 8.04–8.12 (м, 3H, CH<sub>пара</sub>), 8.61 (д, 6H, *J* = 7.7 Гц, CH<sub>орто</sub>)

ЯМР <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>CN): 120.93, 131.42, 136.85, 139.45, 156.72

Масс-спектр (*m/z*, CHCA): 267



#### (4-Метоксифенил)дифенилциклопропенилий тетрафторборат (2.35) [468]

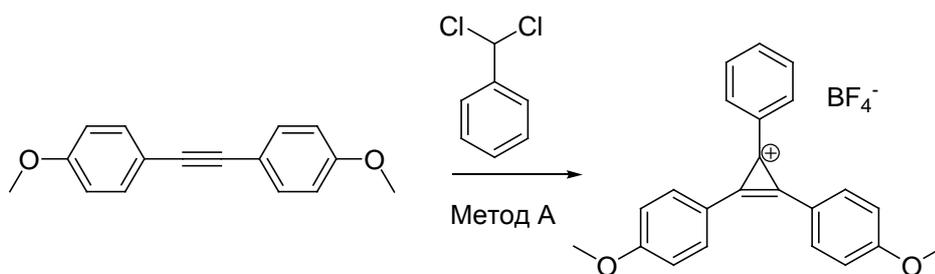
Был синтезирован по методу А. Выход 50%, белое кристаллическое вещество; т. пл. 210°C.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 4.06 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 7.43 (д, 2H, *J* = 8.1 Гц), 7.86–8.00 (м, 4H), 8.01–8.16 (м, 2H), 8.54–8.78 (м, 6H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 56.49, 112.11, 116.12, 120.31, 130.33, 135.33, 137.45, 139.21, 148.66, 152.19, 167.22.

Масс-спектр (*m/z*, CHCA): 297.

146



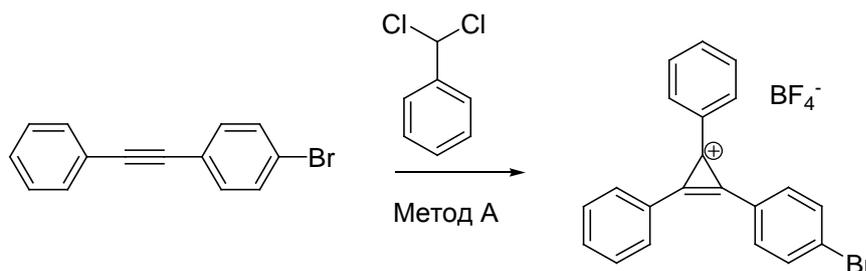
**Фенил-бис-(4-метоксифенил)циклопренилий тетрафторборат (2.36) [469].**

Был синтезирован по методу А. Выход 42%, белое кристаллическое вещество; т. пл. 212–215°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 4.03 (с, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 7.39 (д, 4H,  $J = 7.3$  Гц), 7.89 (м, 2H), 8.02 (м, 1H), 8.57 (м, 6H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 56.39, 112.30, 116.01, 120.47, 130.25, 134.96, 136.91, 138.64, 149.45, 150.55, 166.74.

Масс-спектр ( $m/z$ , CHCA): 327.



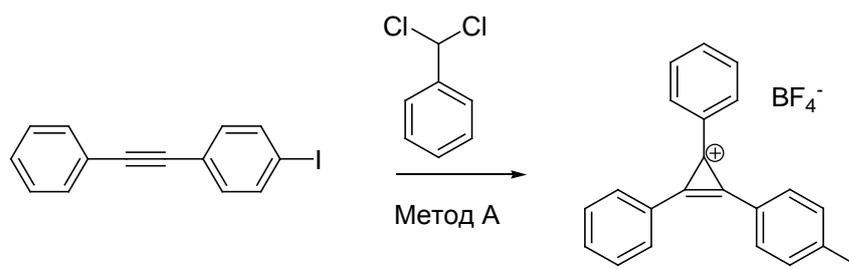
**(4-Бромфенил)дифенилциклопренилий тетрафторборат (2.39).**

Был синтезирован по методу А. Выход 36%, светло-желтое кристаллическое вещество; т. пл. 207–209°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  (CD $_3$ CN): 7.92 (м, 4H), 8.08 (м, 4H), 8.46 (д, 2H,  $J = 8.8$  Гц), 8.58 (д, 4H,  $J = 7.3$  Гц).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (CD $_3$ CN): 119.96, 120.79, 131.41, 134.76, 136.94, 137.98, 139.58, 155.74, 156.70.

Масс-спектр ( $m/z$ , CHCA): 345, 347.



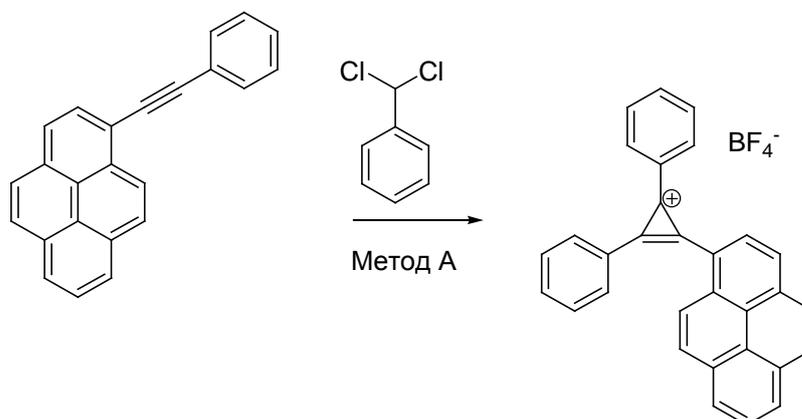
**(4-Иодфенил)дифенилциклопренилий тетрафторборат (2.38).**

Был синтезирован по методу А. Выход 30%, светло-коричневое кристаллическое вещество; т. пл. 229–231°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 7.91 (м, 4H), 8.07 (м, 2H), 8.30 (м, 4H), 8.57 (д, 4H,  $J = 6.6$  Гц).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 120.28, 120.79, 131.41, 136.97, 137.35, 139.56, 140.85, 155.98, 156.72.

Масс-спектр ( $m/z$ , CHCA): 393.



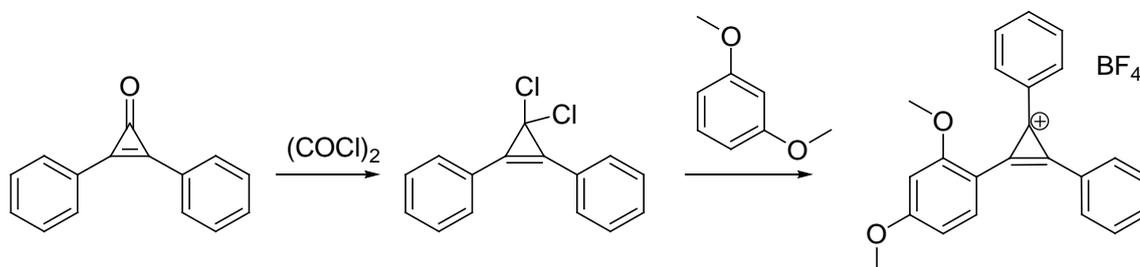
#### Пиренилдифенилциклопропенилий тетрафторборат (2.40).

Был синтезирован по методу А. Выход 40%, коричневое кристаллическое вещество; т. пл. 252–254°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ): 7.90–8.06 (м, 4H), 8.07–8.20 (м, 2H), 8.22–8.38 (м, 2H), 8.41–8.71 (м, 10H), 9.01 (д, 1H,  $J = 8.1$  Гц).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ): 114.30, 121.99, 124.55, 125.31, 125.67, 126.82, 128.71, 129.27, 130.70, 130.81, 131.69, 131.96, 132.29, 133.81, 134.00, 134.87, 135.41, 136.80, 139.60, 140.07, 154.59, 156.84.

Масс-спектр ( $m/z$ , CHCA): 391.



#### (2,4-Диметоксифени)дифенилциклопропенилий тетрафторборат (2.37) [468].

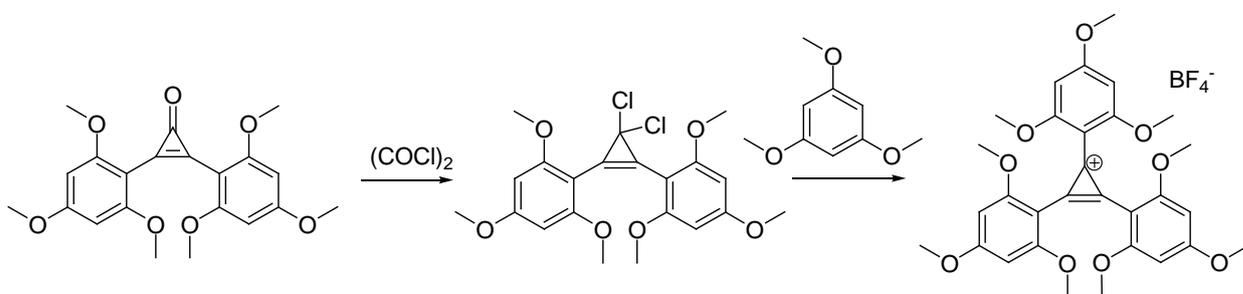
Оксалил хлорид (461 мг, 3.63 ммоль) добавили при перемешивании к раствору дифенилциклопропенона (500 мг, 2.42 ммоль) в ДХМ (3 мл) при 0°C. После перемешивания в течение 1 ч, охлаждение убрали, реакционную смесь нагрели до

комнатной температуры и упарили при пониженном давлении. Полученный дихлорид растворили в ДХМ (4 мл) и к этому раствору добавили раствор 1,3-диметоксибензола (334 г, 2.42 ммоль) в ДХМ (8 мл). К реакционной смеси добавили  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (1 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. Затем охладили до комнатной температуры, добавили  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 мл), выпавший осадок отфильтровали и высушили на масляном насосе. Получили 680 мг (70 %) белого кристаллического вещества; т. пл. 198–201°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 4.06 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.17 (с, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.90–7.08 (м, 2H), 7.81–7.96 (м, 4H), 7.96–8.11 (м, 2H), 8.42 (д, 1H,  $J = 8.8$  Гц), 8.51 (д, 4H,  $J = 7.3$  Гц).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 56.64, 56.79, 98.69, 109.41, 120.86, 130.11, 134.76, 136.72, 139.52, 148.37, 151.15, 164.78, 170.29.

Масс-спектр ( $m/z$ ,  $\text{CHCA}$ ): 327.



### Трис-(2,4,6-триметоксифенил)циклопропенилий тетрафторборат (2.34).

Оксалил хлорид (124 мг, 1 ммоль) добавили при перемешивании к раствору бис-(2,4,6-триметоксифенил)циклопропенона (250 мг, 0.65 ммоль) в ДХМ (3 мл) при 0°C. После перемешивания в течение 1 ч охлаждение убрали, реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и упарили при пониженном давлении. Полученный дихлорид растворили в ДХМ (4 мл) и к этому раствору добавили раствор 1,3,5-триметоксибензола (109 г, 0.65 ммоль) в ДХМ (8 мл). К реакционной смеси добавили  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (1 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. Затем охладили до комнатной температуры, добавили  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 мл), выпавший осадок отфильтровали и высушили на масляном насосе. Получили 210 мг (52 %) белого кристаллического вещества; т. пл. 254–256°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.77 (6с, 18H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.96 (3с, 9H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.20 (6с, 6H,  $\text{CH}_{Ar}$ ).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 56.15, 56.33, 90.66, 95.45, 146.21, 163.78, 169.27.

Масс-спектр ( $m/z$ ,  $\text{CHCA}$ ): 537.

### **Сравнение масс-спектрометрических свойств трифенилтретильного и трифенилциклопропенилиевого катионов**

Приготовили растворы в MeCN трифенилметанола ( $4 \cdot 10^{-2}$  М) и трифенилциклопропений тетрафторбората ( $8 \cdot 10^{-3}$  М). 100 мкл раствора трифенилметанола смешали со 100 мкл раствора трифенилциклопропений тетрафторбората в пластиковой пробирке. К полученной смеси добавили 1 мкл  $\text{HBF}_4$  (50%-водн. раствор) и тщательно перемешали. Отобрали 1 мкл полученной смеси, нанесли в ячейку мишени масс-спектрометра и проанализировали методом MALDI-МС (матрица – синапиновая кислота).

### **Сравнение масс-спектрометрических свойств триарилциклопропенилиевых катионов**

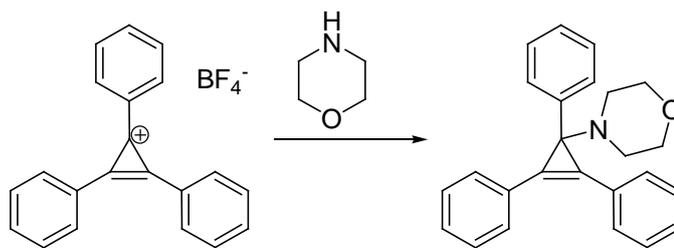
Приготовили растворы в MeCN трифенилциклопропений тетрафторбората, (4-метоксифенил)дифенилциклопропений тетрафторбората, (2,4-диметоксифенил)дифенилциклопропений тетрафторбората и пиренил-дифенилциклопропений тетрафторбората с концентрацией  $10^{-2}$  М. Отобрали по 20 мкл каждого раствора и смешали в пластиковой пробирке, тщательно перемешали. Отобрали 1 мкл полученной смеси, нанесли в ячейку мишени масс-спектрометра и проанализировали методом MALDI-МС (матрица - синапиновая кислота).

### **Определение предела детекции трифенилциклопропений тетрафторбората при исследовании методом MALDI-МС**

7 мг трифенилциклопропений тетрафторбората растворили в 2 мл ацетонитрила и получили раствор с концентрацией  $1 \cdot 10^{-2}$  М. Путем последовательных 10-кратных разбавлений получили ряд растворов, каждый из которых нанесли на мишень (по 1 мкл) и проанализировали методом MALDI-МС (см. приложение таблица 1).

### **Определение предела детекции трифенилциклопропений тетрафторбората при исследовании методом LDI-МС**

7 мг трифенилциклопропений тетрафторбората растворили в 2 мл ацетонитрила и получили раствор с концентрацией  $1 \cdot 10^{-2}$  М. Путем последовательных 10-кратных разбавлений получили ряд растворов, каждый из которых нанесли на мишень (по 1 мкл) и проанализировали методом LDI-МС (см. приложение, таблица 2).

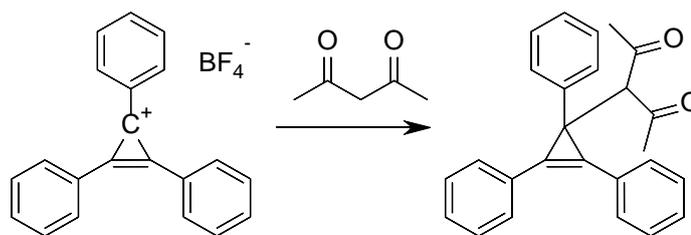


### ***N*-(1,2,3-трифенилциклопропенил)морфолин (2.50) [470]**

К раствору трифенилциклопропенилий тетрафторбората (500 мг, 1.41 ммоль) в MeCN (15 мл) добавили морфолин (260 мг, 3.0 ммоль), смесь перемешивали в течение ночи в атмосфере аргона при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOAc, 5:1 + 1% Et<sub>3</sub>N). Реакционную смесь упарили, добавили к остатку EtOAc (50 мл) и 10%-водн. раствор NaHCO<sub>3</sub> (50 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали, фильтрат упарили при пониженном давлении. Остаток затирали в гексане, полученный осадок отфильтровали и промыли гексаном, высушили на масляном насосе. Получили 278 мг (56 %) белого кристаллического вещества; т. пл. 152–154°C.

ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 2.61 (м, 4H), 3.77 (м, 4H), 7.12–7.19 (м, 1H), 7.22–7.29 (м, 2H), 7.32–7.39 (м, 2H), 7.43 (т, 4H, *J* = 7.4 Гц), 7.53–7.61 (м, 2H), 7.68–7.76 (м, 4H).

ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 50.72, 67.61, 119.44, 125.97(уш), 127.24, 128.24, 129.04, 129.09(уш), 129.81.

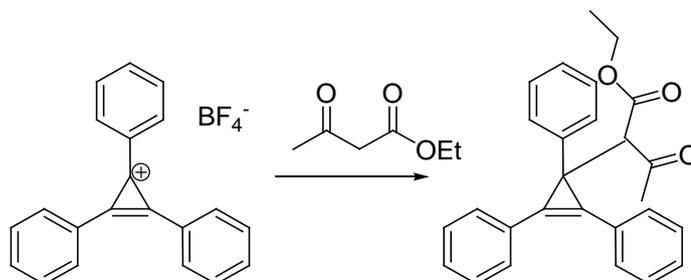


### **3-(1,2,3-Трифенилциклопропенил)-пентан-2,4-дион (2.43) [456].**

Смешали трифенилциклопропенилий тетрафторборат (300 мг, 0.85 ммоль), ацетилацетон (127 мг, 1.27 ммоль), Et<sub>3</sub>N (171 мг, 1.7 ммоль) в бензоле (15 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем добавили к реакционной смеси толуол (30 мл), промыли 5%-водн. раствором лимонной кислоты (30 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (30 мл). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и упарили при пониженном давлении, получили коричневое вязкое масло.

После перекристаллизации из изопропанола получили 210 мг (67%) белого кристаллического вещества; т. пл. 133–135°C (лит. т. пл. 135–137°C).

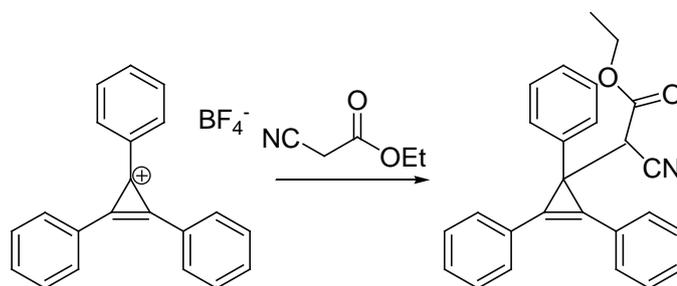
ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.13 (с, 6H), 5.27 (с, 1H), 7.11–7.18 (м, 1H), 7.20–7.31 (м, 4H), 7.36–7.44 (м, 2H), 7.48 (т, 4H,  $J = 7.3$  Гц), 7.85–7.92 (м, 4H).



### Этил 2-(1,2,3-трифенилциклопропенил)ацетоацетат (2.44) [471].

Смешали трифенилциклопропенилий тетрафторборат (300 мг, 0.85 ммоль), этил ацетоацетат (165 мг, 1.27 ммоль),  $\text{Et}_3\text{N}$  (171 мг, 1.7 ммоль) в бензоле (15 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем добавили к реакционной смеси толуол (30 мл), промыли 5%-водн. раствором лимонной кислоты (30 мл) и насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$  (30 мл). Органический слой отделили, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровали и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле ( $n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{EtOAc}$ , 5:1). Получили 250 мг (74%) желтого твердого вещества; т. пл. 132°C (лит. т. пл. 133–134°C).

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.99 (т, 3H,  $J = 7.1$  Гц), 2.17 (с, 3H), 3.96–4.07 (м, 2H), 5.00 (м, 1H), 7.13–7.17 (м, 1H), 7.21–7.27 (м, 2H), 7.28–7.33 (м, 2H), 7.36–7.41 (м, 2H), 7.45–7.51 (м, 4H), 7.89 (т, 4H,  $J = 7.6$  Гц).



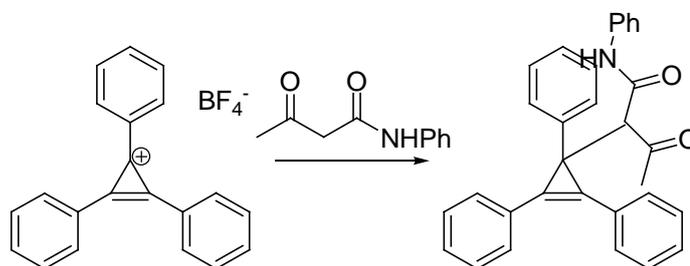
### Этил 2-(1,2,3-трифенилциклопропенил)-2-цианоацетат (2.47).

Смешали трифенилциклопропенилий тетрафторборат (300 мг, 0.85 ммоль), этил цианоацетат (88.5 мкл, 93.8 мг, 0.83 ммоль), ДБУ (124 мкл, 126 мг, 0.83 ммоль) в бензоле (5 мл) при охлаждении в ледяной бане. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч

при комнатной температуре. Затем добавили толуол (20 мл) и воду (20 мл), Органический слой отделили и промыли насыщенным водным раствором NaCl (20 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOAc, 5:1). Получили 195 мг (62%) белого кристаллического вещества; т. пл. 95–98°C.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.77 (т, 3H, *J* = 7.0 Гц, CH<sub>3</sub>), 3.84–3.98 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.54 (с, 1H, C(O)CHC(O)), 7.19–7.23 (м, 1H), 7.28–7.33 (м, 2H), 7.38–7.42 (м, 2H), 7.43–7.6 (м, 6H), 7.77–7.81 (м, 2H), 7.87–7.91 (м, 2H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 13.16, 61.51, 107.36, 116.36, 126.60, 127.72, 127.82, 128.20, 128.29, 128.41, 129.43, 130.82, 131.28, 135.25, 135.35, 138.42, 139.03, 160.96, 165.97.

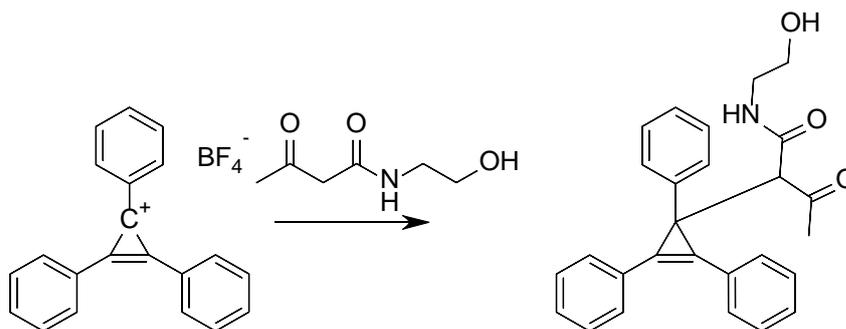


#### ***N*-фенил-2-(1,2,3-трифенилциклопропенил)-ацетоацетамид (2.45).**

Смешали трифенилциклопропенилий тетрафторборат (300 мг, 0.85 ммоль), ацетоацетанилид (130 мг, 0.73 ммоль), ДБУ (120 мг, 0.8 ммоль) в MeCN (15 мл) при охлаждении в ледяной бане и перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOAc, 2:1). После достижения конверсии исходного соединения к реакционной смеси добавили EtOAc (30 мл) и воду (30 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOAc, 5:1). Получили 205 мг (63%) светло-желтой вспененной стеклообразной массы.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.11 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.3 (с, 1H, C(O)CHC(O)), 6.95–7.01 (м, 1H), 7.06–7.11 (м, 1H), 7.16–7.3 (м, 8H), 7.33–7.53 (м, 6H), 7.88 (д, 2H, *J* = 7.0 Гц), 7.95 (д, 2H, *J* = 7.2 Гц), 10.14 (уш. с, 1H, NH).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 29.7, 32.04, 64.92, 115.34, 116.12, 119.34, 123.54, 125.41, 125.99, 127.65, 127.99, 128.05, 128.5, 128.76, 128.93, 129.67, 129.76, 138.35, 145.02, 166.4, 203.47.

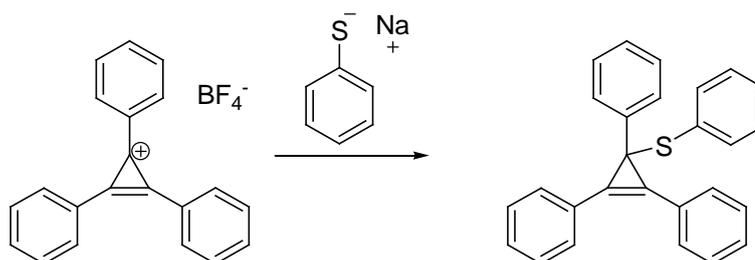


***N*-(2-гидроксиэтил)-2-(1,2,3-трифенилциклопропенил)-ацетоацетамид (2.46).**

Смешали трифенилциклопропенилий тетрафторборат (439 мг, 1.24 ммоль), *N*-(2-гидроксиэтил)ацетоацетамид (180 мг, 1.24 ммоль), DBU (226 мг, 1.49 ммоль) в MeCN (15 мл) при охлаждении в ледяной бане и перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ ( $R_f$  0.6 в EtOAc). К реакционной смеси добавили EtOAc (30 мл) и воду (30 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и упарили при пониженном давлении. Остаток очистили затиранием в диэтиловом эфире, отфильтровали и высушили на воздухе. Получили 350 мг (69%) белого кристаллического вещества.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.05 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.85–2.93 (м, 1H), 2.93–3.04 (м, 2H), 3.06–3.15 (м, 1H), 4.48 (т, 1H,  $J = 5.9$  Гц, -OH), 5.09 (с, 1H, C(O)CHC(O)), 7.03–7.1 (м, 1H), 7.14–7.2 (м, 2H), 7.2–7.26 (м, 2H), 7.36–7.42 (м, 2H), 7.44–7.51 (м, 4H), 7.87 (д, 2H,  $J = 7.7$  Гц), 7.92 (д, 2H,  $J = 7.7$  Гц), 8.1 (уш. с, 1H, NH).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 25.91, 31.77, 41.31, 59.30, 63.97, 115.52, 116.02, 125.26, 126.08, 127.80, 127.92, 128.21, 128.69, 128.76, 128.81, 128.87, 129.73, 129.81, 145.27 167.59, 204.04.



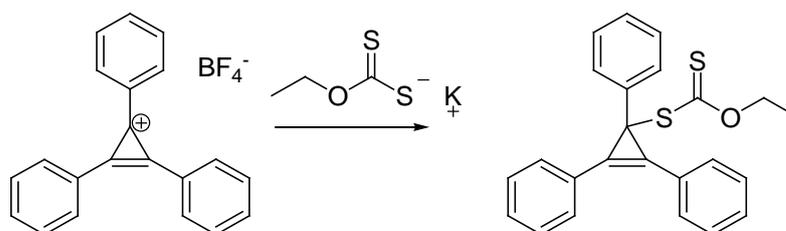
**3-(Фенилтио)трифенилциклопропен (2.52) [457].**

Трифенилциклопропенилий тетрафторборат (400 мг, 1.13 ммоль) растворили в MeCN (15 мл) и к полученном раствору добавили тиофенолят натрия (150 мг, 1.13 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться на ночь в инертной атмосфере при комнатной температуре. После упаривания к остатку добавили EtOAc (50 мл) и воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли водой (50 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток затерли с гексаном, образовавшиеся кристаллы отфильтровали и

высушили на масляном насосе. Получили 260 мг (61%) белого кристаллического вещества; т. пл. 119–122°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.03–7.08 (м, 2H), 7.09–7.14 (м, 1H), 7.2–7.24 (м, 1H), 7.29–7.39 (м, 6H), 7.39–7.45 (м, 4H), 7.63–7.68 (м, 4H), 7.69–7.73 (м, 2H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 42.68, 118.79, 126.43, 127.31, 127.39, 127.54, 128.34, 128.41, 128.94, 129.46, 129.9, 134.63, 134.93, 144.4.

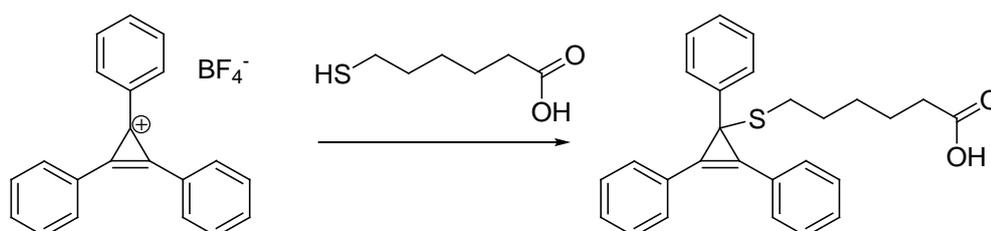


### 3-(Этоксиксантат)трифенилциклопропен (2.54) [216]

Трифенилциклопропенилий тетрафторборат (400 мг, 1.13 ммоль) растворили в MeCN (15 мл) и к полученному раствору добавили этоксиксантат калия (190 мг, 1.13 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 дней в инертной атмосфере при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ ( $n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{EtOAc} = 5:1$ ). После упаривания растворителя, остаток растворили в ДХМ (50 мл) и добавили воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли водной (50 мл), высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили. Остаток затерли с гексаном, образовавшиеся кристаллы отфильтровали и высушили на масляном насосе. Получили 290 мг (63%) желтого кристаллического вещества; т. пл. 159–162°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.14 (т, 3H,  $J = 7.1$  Гц), 4.58 (кв, 2H,  $J = 7.1$  Гц), 7.17–7.22 (м, 1H), 7.26–7.31 (м, 2H), 7.41–7.46 (м, 2H), 7.49 (т, 4H,  $J = 7.4$  Гц), 7.57 (д, 2H,  $J = 7.26$  Гц), 7.8 (д, 4H,  $J = 7.3$  Гц).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 13.49, 42.87, 69.64, 117.95, 126.32, 126.68, 128.27, 129.15, 130.02, 130.06, 143.54, 214.37.



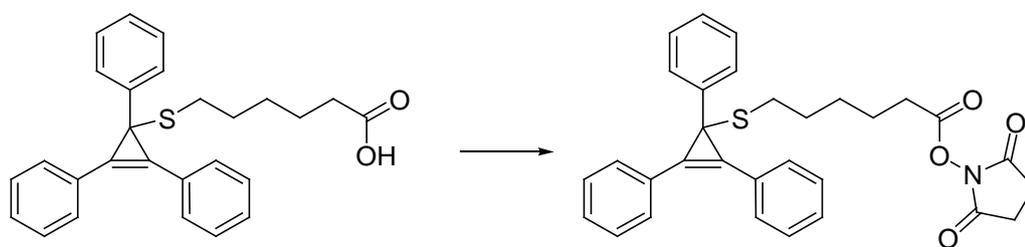
### 6-(Трифенилциклопропенилтио)гексановая кислота (2.56)

Трифенилциклопропенилий тетрафторборат (256 мг, 0.72 ммоль) растворили в MeCN (5 мл) и к полученному раствору добавили 6-меркаптогексановую кислоту (139 мг,

0.93 ммоль) и пиридин (100 мкл) в атмосфере аргона. После перемешивания в течение 12 ч при комнатной температуре в инертной атмосфере реакционную смесь упарили, добавили EtOAc (50 мл) и воду (50 мл). Органический слой отделили, промыли водой (3×50 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (PhMe:EtOAc = 5:1). Получили 120 мг (40%) бесцветного масла.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.11–1.23 (м, 2H), 1.23–1.42 (м, 4H), 2.04 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц), 2.42 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц), 7.14–7.22 (м, 1H), 7.3 (т, 2H, *J* = 7.3 Гц), 7.44–7.61 (м, 8H), 7.79 (д, 4H, *J* = 7.7 Гц), 11.94 (уш. с, 1H).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 23.95, 27.8, 29.52, 30.44, 33.39, 37.89, 118.11, 126.3, 126.72, 126.78, 128.33, 129.38, 129.43, 129.84, 143.92, 174.26.



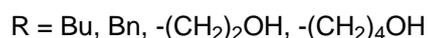
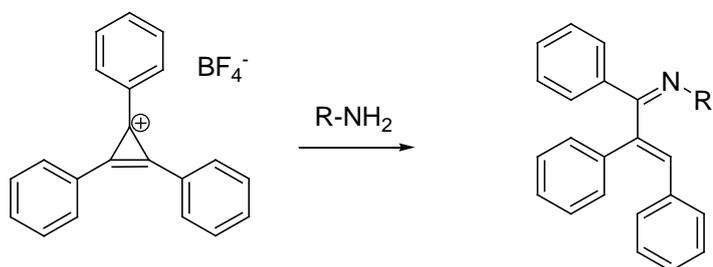
***N*-гидроксисукцинимидный эфир 6-(трифенилциклопропенилтио)гексановой кислоты (2.57).**

6-(Трифенилциклопропенилтио)гексановую кислоту (120 мг, 0.3 ммоль), дисукцинимидилкарбонат (115 мг, 0.45 ммоль, 1.5 экв.) и Et<sub>3</sub>N (100 мкл) растворили в смеси MeCN (10 мл) и ДХМ DCM (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи в инертной атмосфере, затем растворитель упарили, добавили к остатку воду (20 мл) и EtOAc (20 мл), органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (PhMe:EtOAc = 5:1). Получили 75 мг (49%) бесцветного масла.

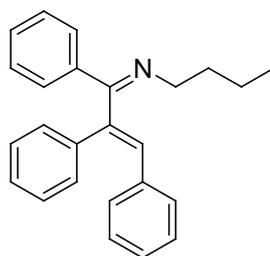
ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.2–1.32 (м, 2H), 1.33–1.46 (м, 4H), 2.37–2.48 (м, 4H), 2.8 (с, 4H), 7.15–7.23 (м, 1H), 7.26–7.34 (м, 2H), 7.45–7.61 (м, 8H), 7.79 (д, 4H, *J* = 7.3 Гц).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 23.65, 25.48, 27.24, 29.29, 29.89, 30.25, 118.13, 126.32, 126.72, 126.78, 128.33, 129.38 (3C), 129.42, 129.85, 143.9, 168.71, 170.14.

**Общая методика реакций трифенилциклопропенилий тетрафторбората с первичными аминами:**



К раствору трифенилциклопропенилий тетрафторбората (200 мг, 0.56 ммоль) в MeCN (10 мл) добавили соответствующий амин (1.41 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение ночи при комнатной температуре. Затем растворитель удалили, к остатку добавили EtOAc (30 мл) и воду (30 мл), органический слой отделили, высушили над  $Na_2SO_4$  и упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле ( $n-C_6H_{14}$ :EtOAc=10:1 + 1%  $Et_3N$ ). Получили следующие соединения:

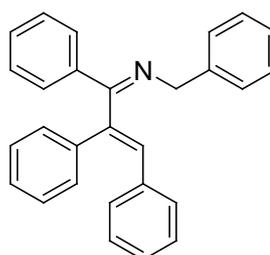


**1,2,3-Трифенил-4-азаоктадиен-1,3 (2.49a).**

Выход 110 мг (58%), желтое масло.

ЯМР  $^1H$  ( $CD_3CN$ ): 0.80 (т, 3H,  $J = 7.4$  Гц), 1.26–1.35 (м, 2H), 1.44–1.60 (м, 2H), 3.29–3.45 (м, 2H), 7.17–7.25 (м, 3H), 7.26–7.31 (м, 1H), 7.31–7.37 (м, 6H), 7.37–7.41 (м, 2H), 7.43–7.46 (м, 2H), 7.88–7.92 (м, 2H).

ЯМР  $^{13}C$  ( $CD_3CN$ ):  $\delta = 14.24, 21.56, 33.64, 54.17, 126.85, 128.59, 129.0, 129.12, 129.35, 129.51, 129.52, 129.96, 130.19, 131.18, 137.25, 137.3, 139.2$  (2C), 167.07.



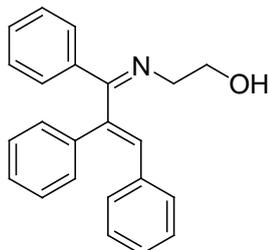
**1,2,3,4-Тетрафенил-4азапентадиен-1,3 (2.49b).**

Выход 109 мг (52%), желтое масло.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 4.55 (м, 1H), 4.64 (м, 1H), 7.17–7.41 (м, 14H), 7.41–7.44 (м, 2H), 7.45 (с, 1H), 7.47–7.51 (м, 2H), 7.95–7.99 (м, 2H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  = 58.07, 126.89, 127.53, 128.77, 128.98, 129.14, 129.22, 129.26, 129.42, 129.53, 129.6, 130.06, 130.65, 131.5, 136.86, 137.12, 138.95, 139.02, 141.5, 168.17.

Масс-спектр:  $m/z$  ( $I$ , %): 372 (66%), 296 (17%), 282 (10%), 91 (100%).

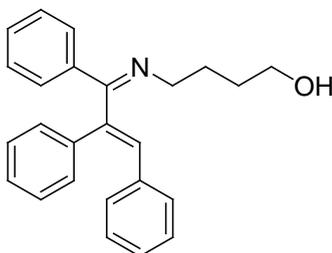


**6-Гидроксо-1,2,3-трифенил-4-азагексадиент-1,3 (2.49с).**

Выход 84 мг (46%), желтое масло.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 3.27–3.35 (м, 1H), 3.41–3.48 (м, 1H), 3.56–3.69 (м, 2H), 4.59 (т, 1H,  $J$  = 5.6 Гц), 7.18–7.32 (м, 4H), 7.33–7.39 (м, 5H), 7.39–7.44 (м, 2H), 7.45 (с, 1H), 7.46–7.49 (м, 2H), 7.82–7.87 (м, 2H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 55.96, 61.22, 125.6, 127.36, 128.02, 128.05, 128.16, 128.52, 128.55, 128.87, 128.94, 130.27, 135.43, 135.65, 137.28, 137.37, 166.75.

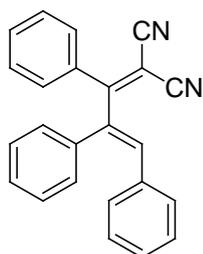


**8-Гидрокси-1,2,3-трифенил-4-азаоктадиен-1,3 (2.49d).**

Выход 80 мг (40%), желтое масло.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.37–1.45 (м, 2H), 1.46–1.61 (м, 2H), 3.23–3.40 (м, 4H), 4.28 (т, 1H,  $J$  = 5.0 Гц), 7.18–7.32 (м, 4H), 7.32–7.46 (м, 10H), 7.82–7.86 (м, 2H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 26.74, 30.64, 52.73, 60.51, 125.45, 127.2, 127.95, 128.0, 128.11, 128.47, 128.53, 128.69, 128.92, 130.14, 135.39, 135.67, 137.42, 137.45, 165.71.



**1,1-Дициано-2,3,4-трифенилбутадиен-1,3 (2.48).**

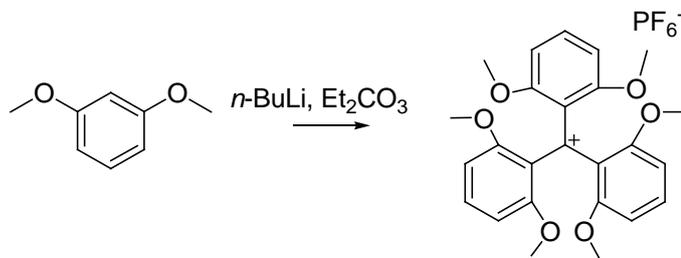
К раствору трифенилциклопропенилий тетрафторбората (400 мг, 1.13 ммоль) в MeCN (20 мл) добавили малонитрил (89 мг, 1.36 ммоль) и ДБУ (206 мг, 1.36 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 20 ч при комнатной температуре, затем растворитель удалили, а к остатку добавили EtOAc (20 мл) и воду (20 мл). Органический слой отделили, последовательно промыли 5%-водн. раствором лимонной кислоты (20 мл), насыщенным раствором NaCl (20 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOAc=10:1). Получили 290 мг (80%) желтого аморфного вещества.

ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 7.29–7.4 (м, 11H), 7.41–7.47 (м, 2H), 7.48–7.52 (м, 1H), 7.82–7.88 (м, 2H).

ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 85.59, 113.18, 113.64, 126.93, 128.84, 128.92, 129.01, 129.17 (3C), 129.4, 130.02, 133.26, 133.67, 135.03, 135.99, 137.19, 138.48, 173.17.

Масс-спектр: *m/z* (*I*, %): 332 (78), 255 (100), 227 (54), 178 (46), 153 (43), 138 (23).

ИК,  $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup> (KBr): 698, 758, 1537, 2227, 3053.

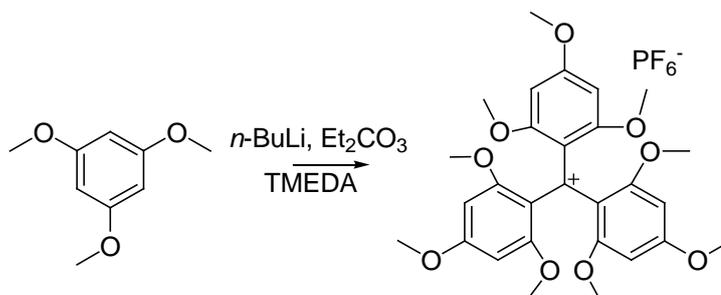


**Гексафторфосфат трис-(2,6-диметоксифенил)карбения (2.59)** [198, 389, 458].

К раствору 1,3-диметоксибензола (10.0 г, 72.4 ммоль) в 100 мл тетрагидрофурана при перемешивании в атмосфере аргона и охлаждении до -20°C прибавили по каплям раствор *n*-бутиллития (2.5M, 30 мл, 76 ммоль). Через час медленно добавили раствор диэтилкарбоната (2.85 г, 24 ммоль) в ТГФ (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение суток. Растворитель упарили, к остатку при перемешивании добавили Et<sub>2</sub>O (200 мл), ДХМ (50 мл) и НРF<sub>6</sub> (30 мл). Через 3 ч растворитель упарили, затерли в Et<sub>2</sub>O (300 мл), выпавшие фиолетовые кристаллы отфильтровали и высушили на масляном насосе. Получили 31.0 г (76%) фиолетового твердого вещества; т. пл. 180°C.

ЯМР <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN): 3.55 (м, 18H, -OCH<sub>3</sub>), 6.61 (6д, 6H, *J* = 8.5 Гц), 7.63 (3т, 3H, *J* = 8.5 Гц).

Масс-спектр (MALDI, *m/z*, CHCA): 423.

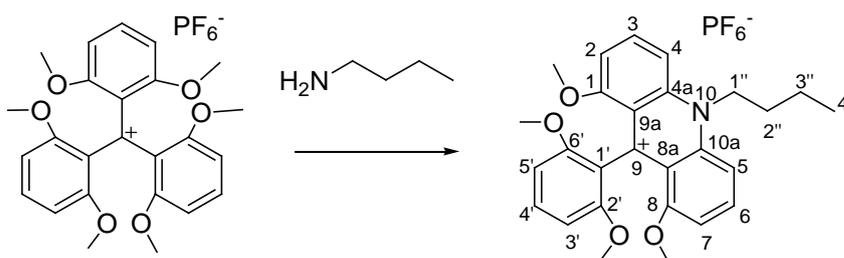


**Гексафторфосфат трис-(2,4,6-триметоксифенил)карбения (2.60) [201].**

К раствору 1,3,5-триметоксибензола (600 мг, 3.57 ммоль) в Et<sub>2</sub>O (15 мл) при - 70°C в инертной атмосфере при перемешивании с помощью шприца добавили TMEDA (620 мг, 5.35 ммоль) в Et<sub>2</sub>O (5 мл), а затем по каплям раствор *n*-бутиллития (2.5М, 1.5 мл). Охлаждение убрали и оставили перемешиваться реакционную смесь на ночь. На следующий день реакционную смесь охладили до - 40°C и добавили диэтилкарбонат (140 мг, 1.19 ммоль). Охлаждение убрали и оставили перемешиваться. Ход реакции контролировали методом ТСХ (ДХМ:MeOH=10:1 + 1% HPF<sub>6</sub>). Через сутки к реакционной смеси добавили воду (1 мл), растворитель упарили, к остатку добавили ДХМ (100 мл), воду (100 мл) и HPF<sub>6</sub> (3 мл), интенсивно перемешивали в течение 15 мин, затем органической слой отделили, промыли водой (200 мл), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель упарили. Остаток залили Et<sub>2</sub>O, затерли и декантировали, процедуру повторили 5 раз. Полученные фиолетовые кристаллы высушили на масляном насосе. Получили 257 мг (36%) фиолетового кристаллического вещества; т. пл. 201°C.

ЯМР <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN): 3.53 (с, 18H, -OCH<sub>3</sub>-орто), 3.94 (с, 9H, -OCH<sub>3</sub>-пара), 6.13 (с, 6H, CH<sub>Ar</sub>).

Масс-спектр (MALDI, *m/z*, CHCA): 513.



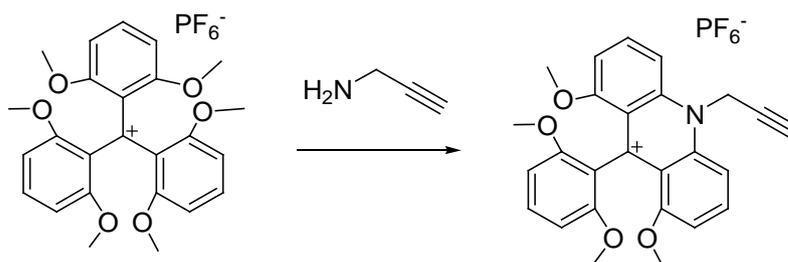
**Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бутил)акридиния (2.61).**

К раствору гексафторфосфата трис-(2,6-диметоксифенил)метилия (1.0 г, 1.76 ммоль) в ацетонитриле (15 мл) при перемешивании при комнатной температуре в атмосфере аргона добавили *n*-бутиламин (350 мкл, 3.52 ммоль). Цвет раствора изменялся от фиолетового к красному. Через 1 ч растворитель удалили при пониженном давлении, твердый осадок затерли в диэтиловом эфире, образовавшийся красный осадок отфильтровали и высушили в эксикаторе при пониженном давлении. Получили 1.0 г (98%) красного кристаллического вещества; т. пл. 240°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 1.15 (т, 3H,  $J = 7.3$  Гц, H-4''), 1.73–1.80 (м, 2H, H-3''), 2.16–2.22 (м, 2H, H-2''), 3.57 (с, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (с, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.06–5.09 (м, 2H, H-1''), 6.81 (д, 2H,  $J = 8.5$  Гц, H-3', H-5'), 7.12 (д 2H,  $J = 8.2$  Гц, H-2, H-7), 7.45–7.48 (м, 1H, H-4'), 7.93 (д, 2H,  $J = 9.2$  Гц, H-4, H-5), 8.20–8.24 (м, 2H, H-3, H-6).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 12.96 (4''), 19.61 (3''), 29.52 (2''), 52.37 (1''), 55.64 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.76 ( $\text{OCH}_3$ ), 103.74 (3', 5'), 106.50 (2, 7), 109.26 (4, 5), 119.67 (1'), 119.89 (9), 129.40 (4'), 139.87 (3, 6), 141.61 (1, 8), 155.79 (2', 6'), 157.18 (8a, 9a), 160.58 (4a, 10a).

Масс-спектр (MALDI,  $m/z$ , CHCA): 432.



### Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(пропаргил)акридиния (2.119).

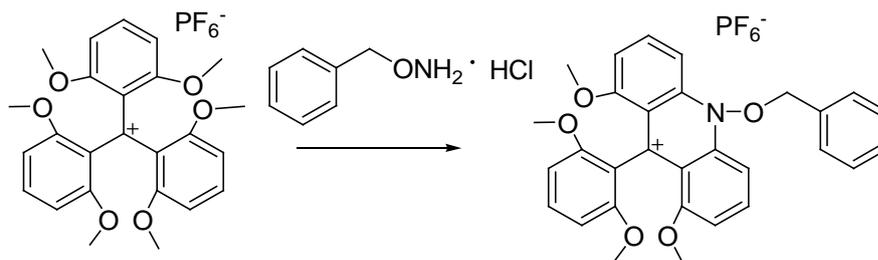
К раствору гексафторфосфата трис-(2,6-диметоксифенил)метилия (300 мг, 0.528 ммоль) в  $\text{MeCN}$  (15 мл) при перемешивании и комнатной температуре добавили по каплям пропаргиламин (72 мкл, 1.056 ммол). Цвет раствора изменился от фиолетового к красному. Ход реакции контролировали методом ТСХ ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 5:1$ ) ( $R_f = 0,4$ ). Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток высушили в вакууме масляного насоса. Получили 190 мг (64%) красного кристаллического соединения.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 3.04 (т, 1H,  $J = 2.5$  Гц,  $\equiv\text{CH}$ ), 3.56 (с, 12H,  $-\text{OCH}_3$ ), 5.78 (д, 2H,  $J = 2.5$  Гц,  $\text{CH}_2$ ), 6.78 (д, 2H,  $J = 8.4$  Гц), 7.13 (д, 2H,  $J = 8.0$  Гц), 7.45 (т, 1H,  $J = 8.4$  Гц,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 7.93 (д, 2H,  $J = 9.0$  Гц), 8.26 (дд, 2H,  $J = 8.0, 9.0$  Гц,  $2\text{CH}_{\text{Ar}}$ ).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 42.88, 55.65, 56.88, 74.91, 77.44, 103.75, 106.87, 108.82, 118.69, 119.80, 129.63, 140.77, 141.55, 155.66, 159.35, 160.86.

ЯМР  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $-73.87, -72.00$ .

Масс-спектр ( $m/z$ , синапиновая кислота): 413.



**Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бензилокси)акридиния (2.91).**

К раствору гексафторфосфата трис-(2,6-диметоксифенил)метилия (200 мг, 0.352 ммоль) в MeCN (10 мл) добавили раствор *O*-бензилгидроксиламина гидрохлорида (64 мг, 0.4 ммоль) в воде (15 мл) воды и Et<sub>3</sub>N (123 мкл, 0,37 ммоль). Цвет раствора изменялся от фиолетового к красному. Ход реакции контролировали методом ТСХ (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1). Растворитель удалили при пониженном давлении, добавили ДХМ (100 мл) и промывали водным раствором HPF<sub>6</sub> (200 мл воды и 1 мл HPF<sub>6</sub>). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровали и упарили. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле системе (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=30:1 + 1% HPF<sub>6</sub>). Получили 187 мг (85%) темно-красного кристаллического вещества.

ЯМР <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN): 3.58 (4с, 12H, -OCH<sub>3</sub>), 5.52 (с, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.80 (д, 2H, *J* = 8.2 Гц), 7.12 (д, 2H, *J* = 8.2 Гц), 7.47 (т, 1H, *J* = 8.4 Гц, CH<sub>Ar-пара</sub>), 7.50–7.55 (м, 3H), 7.65 (м, 2H), 8.22 (т, 2H, *J* = 8.5 Гц).

ЯМР <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>CN): 56.63, 57.84, 81.87, 104.67, 104.80, 107.66, 108.09, 119.63, 120.50, 130.05, 130.82, 131.37, 131.51, 132.66, 139.93, 141.89, 158.06, 161.45.

ЯМР <sup>19</sup>F (CD<sub>3</sub>CN): -72.16, -73.66.

Масс-спектр (m/z, CHCA): 482.

**Методики дериватизации низкомолекулярных биологически активных веществ.**

**а) Дериватизация первичных аминов:**

К 150 мкл 5·10<sup>-3</sup> М раствора соли **2.59** в ацетонитриле добавляли рассчитанное количество амина (если амин использовался в виде соли - дополнительно добавляли 3 экв. триэтиламина), реакционную смесь выдерживали 30 мин при комнатной температуре.

**б) Дериватизация аминокислот, их эфиров и пептидов:**

К 100 мкл 5·10<sup>-3</sup> М раствора соли **2.59** в ацетонитриле добавляли 200 мкл 5·10<sup>-3</sup> М водного раствора соответствующего вещества и 1 мкл триэтиламина, выдерживали 30 мин.

**в) Дериватизация липидных аминов:**

К 50 мкл 1·10<sup>-3</sup> М раствора аминсодержащего липида в смеси хлороформ–метанол (4:1) добавляли 10 мкл 5·10<sup>-3</sup> М раствора соли **2.59** в ацетонитриле и 1 мкл триэтиламина, выдерживали 30 мин.

Во всех случаях анализ продуктов реакции проводили прямо из реакционной смеси, без дополнительной очистки.

**г) Общая методика получения конъюгатов гексафторфосфата трис-(2,6-диметоксифенил)метилия с аминок углеводами (аминоглюцитолом, тобрамицином, паромомицином, сисомицином):**

К 150 мкл  $0.5 \cdot 10^{-2}$  М раствора гексафторфосфата трис-(2,6-диметоксифенил)метилия в ацетонитриле добавляли 1 экв. соответствующего аминок углевода в 200 мкл карбонатного буфера (рН 9.55). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Анализ конъюгатов проводили прямо из реакционной смеси, без дополнительной очистки.

**д) Методика дериватизации смеси антибиотиков:**

Смешали по 10 мкл 0.005 М растворов каждого антибиотика (канамицина, сисомина, тобрамицина и паромомицина) в карбонатном буфере (рН 9.55). К полученному раствору добавили 100 мкл карбонатного буфера (рН 9.55) и 50 мкл 0.005 М раствора соли **2.59** в ацетонитриле. Пробы для анализа отбирали прямо из реакционной смеси.

**е) Методика дериватизации антибиотического комплекса ИНА-5812**

Дериватизация вещества из выделенной фракции (0.1 мг) проводилась в водно-этанольном растворе (100 мкл) в присутствии триэтиламина (1 мкл) действием 20 мкл 0.01М раствора **2.59** в ацетонитриле. После выдерживания реакции в течение 2ч, реакционная смесь была проанализирована методом MALDI-МС.

**ж) Методика синтеза дериватирующего реагента 2.98**

К раствору трифторацетата *N*-(2-аминоэтил)малеимида (1.4 мг, 5 ммоль) в 1.5 мл ацетонитрила добавили гексафторфосфат трис(2,6-диметоксифенил)метилия (3 мг, 5 ммол) и триэтиламин (1.7 мкл). Реакционную смесь выдержали в течение 2 ч при комнатной температуре, разбавали до концентрации  $3.5 \times 10^{-4}$  М и использовали далее полученный стоковый раствор без дополнительной очистки.

**з) Методика дериватизации тиолов**

К раствору **2.98** в ацетонитриле ( $3.5 \times 10^{-4}$  М, 150 мкл) добавляли соответствующие тиолы (2 экв.). Реакционную смесь выдерживали в течение 3 часов при комнатной температуре, а затем без дополнительной очистки проводили анализ методом (МА)LDI-МС.

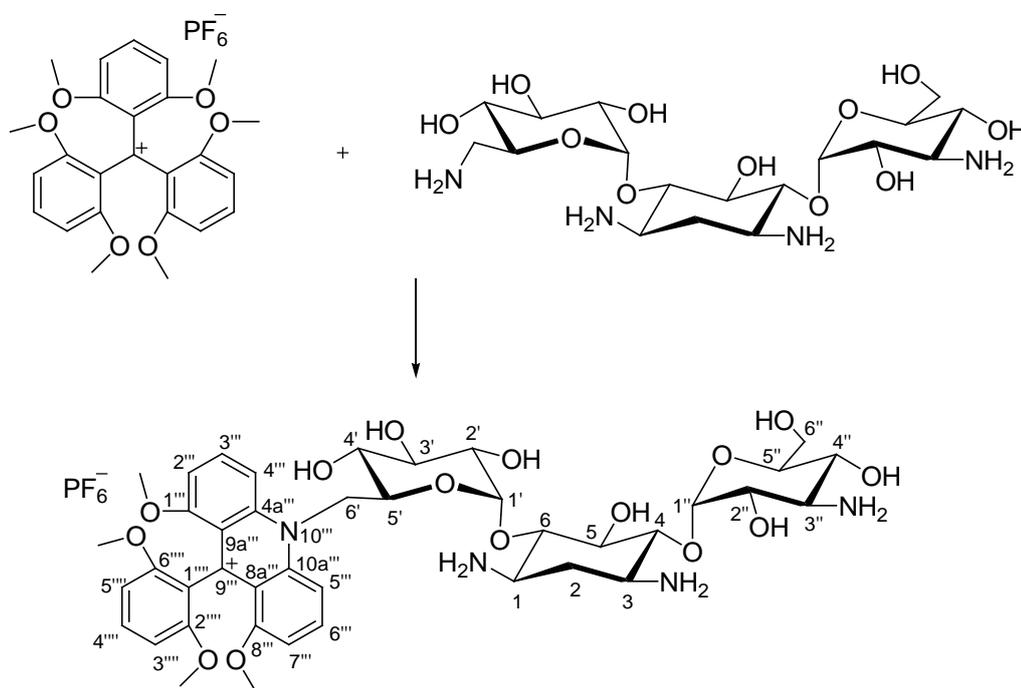
**Определение предела обнаружения гексафторфосфата 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бутил)акридиния**

2.8 мг гексафторфосфата 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бутил)акридиния

растворили в 1 мл ацетонитрила и получили раствор с концентрацией  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Путем последовательных 10-кратных разбавлений получили ряд растворов, каждый из которых нанесли на мишень (по 1 мкл) и проанализировали методом MALDI-МС (см. приложение таблица 3).

### Экспериментальная оценка значения $pK_{R^+}$ соединений **2.59** и **2.116** [218, 219]

Для оценки значения  $pK_{R^+}$  соединений **2.59** и **2.116** был приготовлен ряд растворов в смеси  $H_2O/DMCO/Bu_4NOH$  с различным содержанием ДМСО при постоянной концентрации вещества. Стоковый раствор исходного соединения добавляли непосредственно перед спектрофотометрическими измерениями. Полученные значения оптической плотности в области максимального поглощения карбокатиона ( $\lambda = 289$  нм для **2.59** и  $\lambda = 289$  нм для **2.116**) использовали для расчета соотношения  $[R^+]/[ROH]$ . Для определения значения  $pK_{R^+}$  были построены зависимости  $\log([R^+]/[ROH])$  от функций основности  $H_-$  и  $C_-$ , значения которых для каждого раствора определяется мольным содержанием ДМСО. С учетом погрешности измерений полученные значения  $pK_{R^+}$  составляет  $18.1 \pm 0.5$  (**2.59**) и  $14.0 \pm 0.5$  (**2.116**).



### Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(6'-дезаканамицин-6'-ил)акридиния (**2.96**).

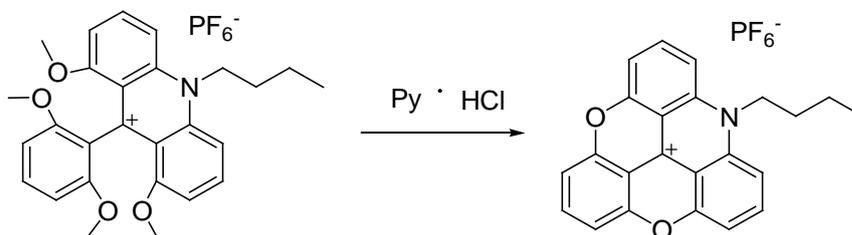
К раствору сульфата канамицина (7.8 мг, 0.015 ммоль) в 2 мл буферного раствора (рН 9.55) при перемешивании добавили гексафторфосфат трис-(2,6-диметоксифенил)метилия

(2.8 мг, 0.005 ммоль) в MeCN (1 мл). Реакционную смесь выдержали 30 мин и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ. Получили 10.9 мг (74%) продукта.

ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 1.69–1.72 (м, 1H, H-2), 2.31–2.33 (м, 1H, H-2), 3.17–3.22 (м, 1H, H-3''), 3.36 (м, 1H, H-2'), 3.38 (м, 1H, H-1/H-3), 3.40 (м, 1H, H-4'), 3.45 (м, 1H, H-1/H-3), 3.48 (м, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.50 (м, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.51 (м, 1H, H-3'), 3.52 (м, 1H, H-6''), 3.53 (м, 1H, H-4''), 3.56 (м, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.57 (м, 1H, H4/6), 3.60 (м, 1H, H-6''), 3.66 (м, 1H, H4/6), 3.68 (м, 1H, H-2''), 3.73 (м, 1H, H-5), 3.76 (м, 1H, H-5''), 4.57–4.60 (м, 1H, H-5'), 4.74 (с, 1H, OH), 5.03 (д,  $J = 3.7$  Гц, 1H, H-1''), 5.26 (с, 1H, OH), 5.32 (м, 1H, H-1'), 5.35 (м, 1H, H-6'), 5.55 (м, 1H, H-6'), 6.49 (м, 1H, OH), 6.79–6.83 (м, 2H, H-3''', H-5'''), 6.91 (с, 1H, OH), 7.17 (м, 1H, H-2'''), 7.20 (м, 1H, H-7'''), 7.42–7.45 (т, 1H,  $J = 8.5$  Гц, H-4'''), 8.18 (м, 1H, H-3'''), 8.19 (м, 1H, H-6'''), 8.33–8.35 (м, 1H, H-5'''), 8.45 (м, 1H, H-4''').

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 27.48 (2), 46.78 (1/3), 49.28 (1/3), 53.34 (6'), 55.32 (3''), 55.87 (OCH<sub>3</sub>), 57.06 (OCH<sub>3</sub>), 59.49 (6''), 65.28 (4''), 68.39 (2''), 70.49 (5'), 70.94 (5), 70.98 (2'), 72.33 (4'), 72.58 (3'), 73.08 (5''), 80.33 (6/4), 83.46 (4/6), 95.66 (1'), 99.28 (1''), 103.57 (3''''/5'''), 103.79 (3''''/5'''), 106.50 (2'''), 106.75 (7'''), 110.78 (5'''), 111.12 (4'''), 117.60 (1'''), 119.21 (2''''/6'''), 119.30 (2''''/6'''), 129.19 (4'''), 139.08 (3'''), 139.68 (6'''), 142.32 (1'''/8'''), 143.00 (8'''/1'''), 155.65 (9'''), 156.39 (10a'''/4a'''), 158.37 (9a'''/8a'''), 159.63 (8a'''/9a'''), 159.70 (4a'''/10a''').

Масс-спектр (MALDI,  $m/z$ , CHCA): 843.



### Гексафторфосфат азадиоксо-10-(бутил)триангуления (2.116).

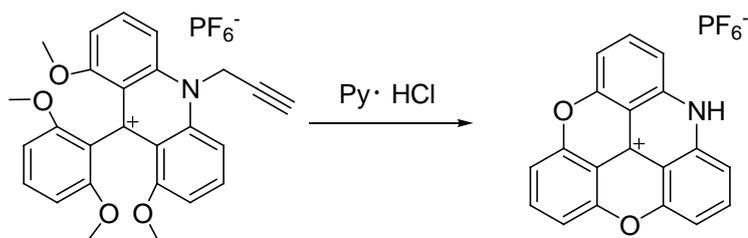
Смесь гексафторфосфата 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бутил)акридиния (500 мг, 0,867 ммоль) и гидрохлорида пиридиния (7 г 60,3 ммоль) при перемешивании нагрели до температуры 200°C в атмосфере аргона. Нагревание продолжали в течение часа. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры к реакционной смеси добавили раствор HPF<sub>6</sub> (50 мл воды и 5 мл 60% HPF<sub>6</sub>) и перемешивали в течение 15 мин. Осадок красного цвета отфильтровали и промыли водой, высушили на масляном насосе. (ТСХ в системе CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1). Продукт очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1+ 1% HPF<sub>6</sub>). Получили 320 мг (76%) кирпично-красного кристаллического вещества; т. пл. 233–235°C.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 1.07 (т, 3H,  $J = 7.3$  Гц,  $-\text{CH}_3$ ), 1.57–1.73 (м, 2H), 1.94 (м, 2H), 4.67 (т, 2H,  $J = 8.1$  Гц,  $\text{NCH}_2$ ), 7.40 (д, 2H,  $J = 8.4$  Гц), 7.49 (д, 2H,  $J = 8.2$  Гц), 7.79 (д, 2H,  $J = 9.0$  Гц), 8.04 (т, 1H,  $J = 8.4$  Гц,  $\text{CH}_{\text{Ar-пара}}$ ), 8.30 (т, 2H,  $J = 8.5$  Гц,  $2\text{CH}_{\text{Ar-пара}}$ ).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 13.00, 19.58, 28.23, 48.60, 105.24, 108.60, 109.31, 110.31, 111.55, 139.82, 140.27, 140.37, 140.87, 152.15, 152.95.

ЯМР  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $-73.91$ ,  $-72.03$ .

Масс-спектр ( $m/z$ , синапиновая кислота): 340



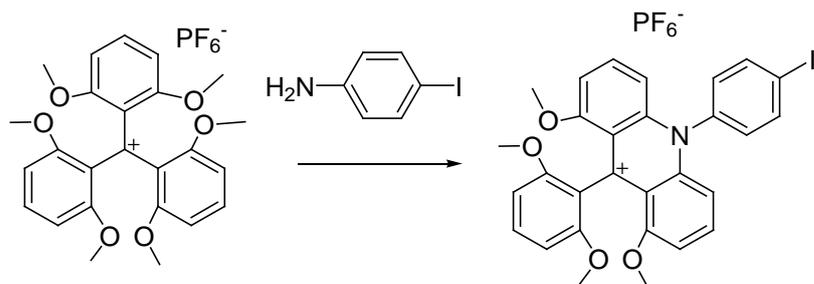
### Гексафторфосфат гидроазадиоксотриангуления (2.120)

Смесь гексафторфосфата 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(пропаргил)-акридиния (130 мг, 0.233 ммоль) и гидрохлорида пиридиния (2 г, 17.3 ммоль) при перемешивании нагрели до температуры  $200^\circ\text{C}$  в атмосфере аргона. Нагревание продолжали в течение 2 ч. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры добавили раствор  $\text{HPF}_6$  (50 мл воды и 5 мл  $\text{HPF}_6$ ) и перемешивали в течение 15 мин. Осадок красного цвета отфильтровали и промыли водой, высушили на масляном насосе. (ТСХ в системе  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=5:1$ ). Продукт очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=5:1+1\%$   $\text{HPF}_6$ ). Получили 90 мг (83%) красного кристаллического вещества.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 7.48 (д, 2H,  $J = 8.0$  Гц), 7.50 (д, 2H,  $J = 8.2$  Гц), 7.61 (д, 2H,  $J = 8.4$  Гц), 8.07 (т, 1H,  $J = 8.4$  Гц,  $\text{CH}_{\text{Ar-пара}}$ ), 8.22 (дд, 2H,  $J = 8.2, 8.0$  Гц,  $2\text{CH}_{\text{Ar-пара}}$ ).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 105.73, 108.25, 108.72, 111.78, 112.13, 139.94 (2C), 140.55 (2C), 152.10, 152.45.

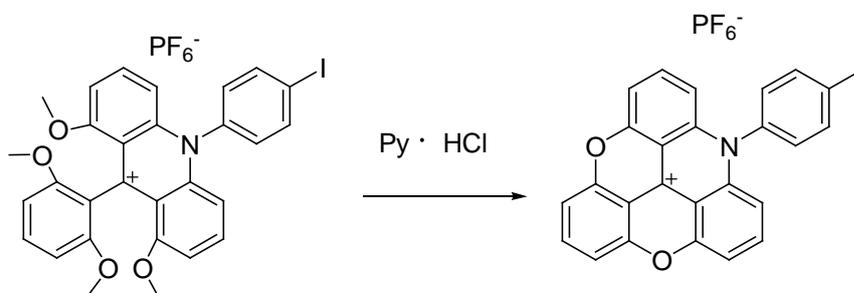
Масс-спектр ( $m/z$ , синапиновая кислота): 284.



**Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(4-иодфенил)акридиния (2.121) [234].**

Смесь гексафторфосфата трис-(2,6-диметоксифенил)метилия (400 мг, 0,704 ммоль) и 4-иоданилина (161 мг, 0,739 ммоль) растворили в 2,6-диметилпиридине (10 мл) и перемешивали в атмосфере аргона при температуре 140°C в течение 2 ч. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры к реакционной смеси добавили Et<sub>2</sub>O (15 мл) и гексан (15 мл) и перемешивали в течение 15 мин, после чего декантировали растворитель, маслянистый осадок растворили в ДХМ (200 мл), промыли водным раствором HPF<sub>6</sub> (200 мл воды и 1 мл HPF<sub>6</sub>), высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удалили растворитель при пониженном давлении. Продукт использовали без дополнительной очистки. Получили 310 мг (61 %) темно-красного кристаллического вещества.

Масс-спектр (*m/z*, CHCA): 578.



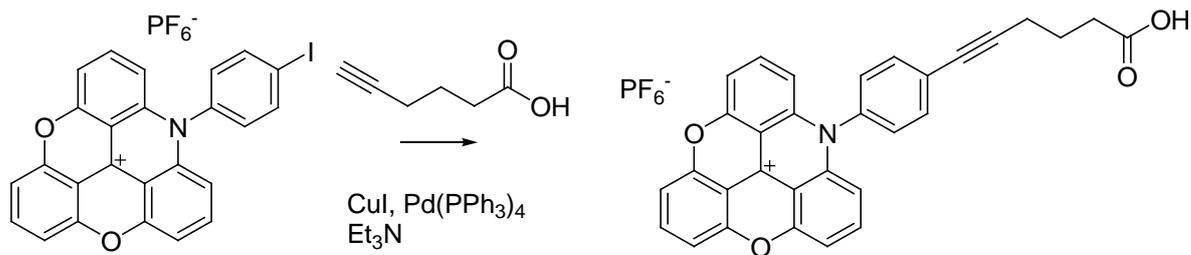
**Гексафторфосфат азадиоксо-10-(4-иодфенил)триангуления (2.122) [234].**

Смесь гексафторфосфата 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(*p*-иодфенил)-акридиния (270 мг, 0,372 ммоль) и гидрохлорида пиридиния (2 г, 17,3 ммоль) при перемешивании нагрели до температуры 200°C в атмосфере аргона. Нагревание продолжали в течение часа. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры к реакционной смеси добавили раствор HPF<sub>6</sub> (50 мл воды и 5 мл 60% HPF<sub>6</sub>) и перемешивали в течение 15 мин. Осадок красного цвета отфильтровали и промыли водой, высушили на масляном насосе. (ТСХ в системе CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1). Продукт очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1+ 1% HPF<sub>6</sub>). Получили 160 мг (68 %) красно-оранжевого соединения.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 6.94 (д, 2H, *J* = 8.8 Гц), 7.49 (д, 2H, *J* = 8.6 Гц), 7.70 (д, 2H, *J* = 8.3 Гц), 7.71 (д, 2H, *J* = 8.1 Гц), 8.23–8.26 (м, 3H), 8.29 (д, 2H, *J* = 8.6 Гц).

ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 98.31, 105.52, 108.12, 109.40, 111.08, 111.85, 130.18, 136.19, 140.36, 140.80, 140.95, 141.25, 141.41, 151.99, 154.28.

Масс-спектр (*m/z*, CHCA): 486.

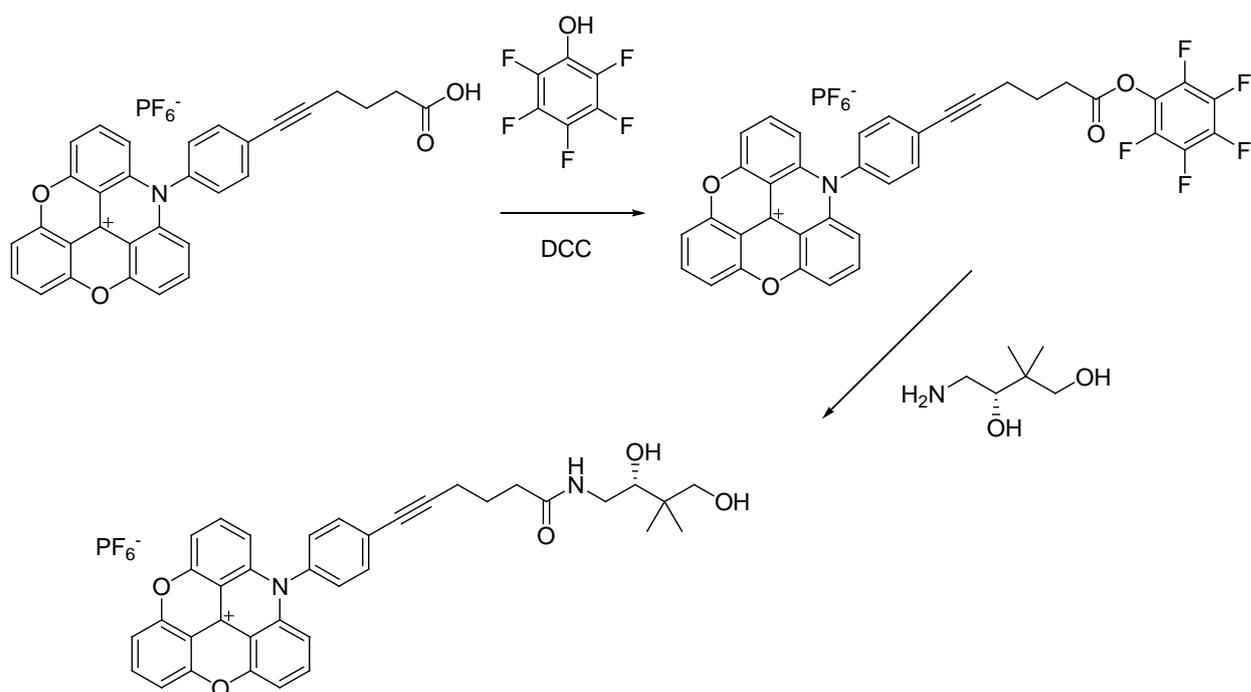


**Гексафторфосфат 10-[4-(5-карбокспент-1-ин-1-ил)фенил]азадиоксотриангуления (2.123).**

Гексафторфосфат азадиоксо-10-(4-иодфенил)триангуления (175 мг, 0.277 ммоль) растворили в ДМФА (15 мл) и последовательно добавили гекс-1-ин-5-овую кислоту (93 мг, 0.832 ммоль), CuI (26 мг, 0.136 ммоль) и Et<sub>3</sub>N (270 мкл, 1.941 ммоль). При тщательном перемешивании в атмосфере аргона к полученной смеси добавили тетраakis(трифенил)фосфинпалладий (64 мг, 0.056 ммоль) и оставили перемешиваться на ночь при комнатной температуре. Ход реакции контролировали методом ТСХ в системе CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1. Затем растворитель удалили при пониженном давлении, остаток растворили в ДХМ (30 мл) и промыли раствором HPF<sub>6</sub> (30 мл воды и 0.5 мл HPF<sub>6</sub>). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1+ 1% HPF<sub>6</sub>). Получили 70 мг (41 %) красно-оранжевого вещества.

ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.84 (м, 2H), 2.42–2.47 (м, 2H), 2.57 (т, 2H, *J* = 7.0 Гц), 6.92 (д, 2H, *J* = 8.8 Гц), 7.66 (д, 2H, *J* = 8.4 Гц), 7.71 (д, 2H, *J* = 8.4 Гц), 7.72 (д, 2H, *J* = 8.0 Гц), 7.9 (д, 2H, *J* = 8.4 Гц), 8.19–8.31 (м, 3H), 12.18 (с, 1H, CO<sub>2</sub>H).

Масс-спектр (*m/z*, синапиновая кислота): 470.



**Гексафторфосфат (R) 10-[4-((2,4-дигидрокси-3,3-диметилбутил)амино-5-карбонилпент-1-ин-1-ил)фенил]азадиоксотриангуления (2.125).**

К раствору гексафторфосфат 10-[4-(5-карбоксопент-1-ин-1-ил)фенил]азадиоксотриангуления (150 мг, 0.243 ммоль) в ДХМ (15 мл) при перемешивании добавили пентафторфенол (54 мг, 0.293 ммоль). Реакционную смесь охладили до 0°C и добавили раствор дициклогексилкарбодиимида (54 мг, 0.293 ммоль) в ДХМ (5 мл). Ход реакции контролировали методом ТСХ в системе  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 5:1$ . Образовавшийся осадок отфильтровали, промыли ДХМ (5 мл), фильтрат упарили и добавили к нему  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 мл) и гексан (20 мл). После затирания образовавшийся красный осадок отфильтровали и высушили на масляном насосе. Продукт использовали без дополнительной очистки. Получили 100 мг (53%) красного кристаллического вещества.

К раствору (3R)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диола (21 мг, 0.14 ммоль) в ДХМ (30 мл) последовательно добавили  $\text{Et}_3\text{N}$  (100 мкл) и гексафторфосфат 10-[4-((О-пентафторфенил)5-карбоксопент-1-ин-1-ил)фенил]азадиоксотриангуления (100 мг, 0.128 ммоль). Ход реакции контролировали методом ТСХ в системе  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=5:1$ . Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток очистили методом колоночной хроматографии на силиагеле в системе ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=5:1+ 1\% \text{HPF}_6$ ). Получили 35 мг (37 %) красного кристаллического вещества.

ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 0.79 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 0.80 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.83 (м, 2H), 2.30 (м, 2H), 2.55 (м, 2H), 3.17–3.29 (м, 2H), 3.38–3.39 (м, 1H), 3.41–3.45 (м, 2H), 4.5 (с, 2H), 6.91 (д, 2H,  $J = 8.8$

Гц), 7.68 (д, 2H,  $J = 8.6$  Гц), 7.75 (м, 4H), 7.76–7.82 (м, 1H), 7.91 (д, 2H,  $J = 8.6$  Гц), 8.24 (м, 3H).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 18.44, 19.84, 21.04, 24.39, 34.32, 38.60, 41.32, 45.72, 68.10, 73.99, 79.76, 93.21, 105.64, 108.24, 109.43, 111.05, 111.92, 126.22, 128.45, 134.67, 135.70, 140.97, 141.39, 141.50, 152.07, 152.37, 171.69.

ЯМР  $^{19}\text{F}$  (DMSO- $d_6$ ): -69.23, -71.12.

Масс-спектр ( $m/z$ , синапиновая кислота): 585.

## 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 атомоль) 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 аминогруппу – низкомолекулярных органических аминов, аминокислот, пептидов, фосфолипидов, пептидных и аминогликозидных 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)метилового катиона и *N*-(2-аминоэтил)малеимида для детекции тиол-содержащих органических соединений, лекарственных препаратов и их смесей, а также дисульфидов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает сердечную благодарность А.А. Формановскому за руководство диссертационной работой, В.А. Коршуну и А.В. Устинову за постоянную помощь и поддержку, а также руководителю Лаборатории изотопных методов анализа Ю.С. Скоблову за создание условий для выполнения исследований.

Автор благодарен коллегам из лабораторий углеводов и химии липидов ИБХ РАН за предоставленные образцы соединений. Автор особенно признателен И.В. Михуре (ИБХ РАН) за критические замечания при подготовке рукописи диссертации и публикаций, Р.С. Борисову (ИНХС РАН) и И.А. Прохоренко (ИБХ РАН) – за ценные консультации, Е.Е. Быкову (НИИНА РАМН) – за помощь в проведении квантово-химических расчетов, Е.А. Рогожину (ИБХ РАН) – за помощь в аналитических экспериментах, Е.Д. Даевой (ИОХ РАН) – за регистрацию ЯМР-спектров; О.М. Ивановой (ИБХ РАН), Н.Ю. Половкову (ИНХС РАН), М.С. Слюндиной (ИНХС РАН) – за регистрацию масс-спектров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Некоторые журналы по масс-спектрометрии:**  
 Biological Mass Spectrometry (1974–1994)  
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1096-9888b](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1096-9888b)  
 European Journal of Mass Spectrometry (1995– ) <http://www.impublications.com/ejms>  
 International Journal of Mass Spectrometry (1998– )  
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/13873806>  
 ранее выходил как  
 International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes  
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01681176> (1984–1998)  
 Journal of the American Society for Mass Spectrometry (1990– )  
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/10440305> (открытый архив 1990–2010)  
<http://link.springer.com/journal/13361> (с 2011 г.)  
 Journal of Mass Spectrometry (1968– )  
<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291096-9888c>  
 Mass Spectrometry (2012– )  
[www.jstage.jst.go.jp/browse/massspectrometry](http://www.jstage.jst.go.jp/browse/massspectrometry)  
 Mass Spectrometry Letters (2010– )  
<http://www.msletters.org>  
 Mass Spectrometry Reviews (1982– )  
<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291098-2787>  
 Rapid Communications in Mass Spectrometry (1987– )  
<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291097-0231>  
 Масс-спектрометрия (2004– ) <http://mass-spektrometria.ru/>
2. *R.J. Cotter*. Time-of-flight mass spectrometry. Instrumentation and application. ACS Publishing: Washington, **1997**.
3. *C.G. Herbert, R.A.W. Johnstone*. Mass spectrometry basics. CRC Press: Boca Raton, **2002**.
4. Applied electrospray mass spectrometry. B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, M.L. Gross, Eds, Marcel Dekker: Basel, **2002**.
5. *K. Downard*. Mass spectrometry. A foundation course. RSC Publishing: Cambridge, **2004**.
6. Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook. S.M. Nelms, Ed., Blackwell Publishing/CRC Press: Oxford, **2005**.
7. MALDI MS. A practical guide to instrumentation, methods and applications. F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, Eds, Wiley: Weinheim, **2007**.
8. *J.T. Watson, O.D. Sparkman* Introduction to mass spectrometry. Instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4<sup>th</sup> Edition. Wiley: Hoboken, **2007**.
9. Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. Principles, tools, and applications for accurate mass analysis. I. Ferrer, E.M. Thurman, Eds, Wiley: Hoboken, **2009**.

10. Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation, and applications. R. Ekman, J. Silberring, A. Westman-Brinkmalm, A. Kraj, Eds, Wiley: Hoboken, **2009**.
11. *A.I. Mallet, S. Down*. Dictionary of mass spectrometry. Wiley: Halesworth, **2010**.
12. Electrospray and MALDI mass spectrometry. 2<sup>nd</sup> Edition. R.B. Cole, Ed., Wiley: Hoboken, **2010**.
13. *J.H. Gross*. Mass spectrometry. A textbook. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer: Heidelberg, **2010**.
14. Ion mobility spectrometry – mass spectrometry. C.L. Wilkins, S. Trimpin, Eds, CRC Press: Boca Raton, **2011**.
15. Comprehensive chromatography in combination with mass spectrometry. L. Mondello, Ed., Wiley: Hoboken, **2011**.
16. Fundamentals of mass spectrometry. K. Hiraoka, Ed., Springer: NY, **2013**.
17. Applications of MALDI-TOF spectroscopy. Z. Cai, S. Liu, Eds, Springer: Heidelberg, **2013** (*Top. Curr. Chem.*, Vol. 331).

**Некоторые монографии по специальным областям применения масс-спектрометрии:**

18. *M. Kinter, N.E. Sherman*. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley: NY, **2000**.
19. Mass spectrometry of natural substances in food. F.A. Mellon, R. Self, J.R. Startin, Eds, RSC Publishing: Cambridge, **2000**.
20. Mass spectrometry in biology & medicine. A.L. Burlingame, S.A. Carr, M.A. Baldwin, Eds, Springer/Humana: NY, **2000**.
21. Mass spectrometry and genomic analysis. J.N. Housby, Ed., Kluwer Academic Publishers: NY, **2001**.
22. Mass spectrometry in drug discovery. D.T. Rossi, M.W. Sinz, Eds, Marcel Dekker: NY, **2001**.
23. *M.S. Lee*. LC/MS applications in drug development. Wiley: NY, **2002**.
24. *J. Roboz*. Mass spectrometry in cancer research. CRC Press: Boca Raton, **2002**.
25. *H. Pasch, W. Schrepp*. MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers. Springer: Berlin, **2003**.
26. Advances in forensic application of mass spectrometry. J. Yinon, Ed., CRC Press: Boca Raton, **2004**.
27. Biological mass spectrometry. A.L. Burlingame, Ed., Academic Press: San Diego, **2005** (*Meth. Enzymol.*, Vol. 402).
28. *R.E. March, J.F.J. Todd*. Quadrupole ion trap mass spectrometry. 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley: Hoboken, **2005**.
29. Modern methods for lipid analysis by liquid chromatography/mass spectrometry and related techniques. W.C. Byrdwell, Ed., AOCS Press: Champaign, **2005**.
30. *I.A. Kaltashov, S.J. Eyles*. Mass spectrometry in biophysics. Conformation and dynamics of biomolecules. Wiley: Hoboken, **2005**.
31. Mass spectrometry: Modified proteins and glycoconjugates. A.L. Burlingame, Ed., Academic Press: San Diego, **2005** (*Meth. Enzymol.*, Vol. 405).
32. Acceleration and improvement of protein identification by mass spectrometry.

- W.V. Bienvenut, Ed., Springer: Dordrecht, **2005**.
33. Redox proteomics. From protein modifications to cellular dysfunction and diseases. I. Dalla-Donne, A. Scaloni, D.A. Butterfield, Eds, Wiley: Hoboken, **2006**.
  34. Identification of microorganisms by mass spectrometry. C.L. Wilkins, J.O. Kay, Jr., Eds, Wiley: Hoboken, **2006**.
  35. *J.L. Holmes, C. Aubry, P.M. Mayer*. Assigning structures to ions in mass spectrometry. CRC Press: Boca Raton, **2006**.
  36. Principles of mass spectrometry applied to biomolecules. J. Laskin, C. Lifshitz, Eds, Wiley: Hoboken, **2006**.
  37. *S.G. Villas-Bôas, U. Roessner, M.A.E. Hansen, J. Smedsgaard, J. Nielsen*. Metabolome analysis. An introduction. Wiley: Hoboken, **2007**.
  38. Lipidomics and bioactive lipids: mass-spectrometry-based lipid analysis. H.A. Brown, Ed., Academic Press: San Diego, **2007** (*Meth. Enzymol.*, Vol. 432).
  39. *E. de Hoffman, V. Stroobant*. Mass spectrometry. Principles and applications. 3<sup>rd</sup> Ed. Wiley: Chichester, **2007**.
  40. Computational methods for mass spectrometry proteomics. I. Eidhammer, K. Flikka, L. Martens, S.-O. Mikalsen, Eds, Wiley: Chichester, **2007**.
  41. Mass spectrometry in medicinal chemistry. K.T. Wanner, G. Höfner, Eds, Wiley: Hoboken, **2007**.
  42. *N. Takahashi, T. Isobe*. Proteomic biology using LC-MS. Large scale analysis of cellular dynamics and function. Wiley: Hoboken, **2008**.
  43. Applications of mass spectrometry in life safety. C. Popescu, A.D. Zamfir, N. Dinca, Eds, Springer: Dordrecht, **2008**.
  44. Medical applications of mass spectrometry. K. Vékey, A. Telekes, A. Vertes, Eds, Elsevier: Amsterdam, **2008**.
  45. Trace quantitative analysis by mass spectrometry. R.K. Boyd, C. Basic, R.A. Bethem, Eds, Wiley: Chichester, **2008**.
  46. Plant proteomics. Technologies, strategies, and applications. G.K. Agrawal, R. Rakwal, Eds, Wiley: Hoboken, **2008**.
  47. Secondary ion mass spectrometry in the earth sciences: cleaning the big picture from a small spot. M. Fayek, Ed., Mineralogical Association of Canada: Toronto, **2009**.
  48. Miniaturization and mass spectrometry. S. Le Gac, A. van den Berg, Eds, RSC Publishing: Cambridge, **2009**.
  49. Mass spectrometry of nucleosides and nucleic acids. J.H. Banoub, P.A. Limbach, Eds, CRC Press: Boca Raton, **2009**.
  50. Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics. R. Ramanathan, Ed., Wiley: Hoboken, **2009**.
  51. Organic mass spectrometry in art and archaeology. M.P. Colombini, F. Modugno, Eds, Wiley: Chichester, **2009**.
  52. *V. Zaikin, J. Halket*. A handbook of derivatives for mass spectrometry. IM Publications: Chichester, **2009**.
  53. *R. Flamini, P. Traldi*. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Wiley: Hoboken, **2010**.

54. *M. Thevis*. Mass spectrometry in sports drug testing. Characterization of prohibited substances and doping control analytical assays. Wiley: Hoboken, **2010**.
55. Imaging mass spectrometry. M. Setou, Ed., Springer: Tokyo, **2010**.
56. MALDI mass spectrometry for synthetic polymer analysis. L. Li, Ed., Wiley: Hoboken, **2010**.
57. Mass spectrometry and nutrition research. L.B. Fay, M. Kussmann, Eds, RSC Publishing: Cambridge, **2010**.
58. *W.D. Lehmann*. Protein phosphorylation analysis by electrospray mass spectrometry. A guide to concepts and practice. RSC Publishing: Cambridge, **2010**.
59. Practical aspects of trapped ion mass spectrometry. IV. Theory and instrumentation. R.E. March, J.F.J. Todd, Eds, CRC Press: Boca Raton, **2010**.
60. Mass spectrometry for microbial proteomics. H.N. Shah, S.E. Gharbia, Eds, Wiley: Chichester, **2010**.
61. Mass spectrometry in drug metabolism and disposition. M.S. Lee, M. Zhu, Eds, Wiley: Hoboken, **2011**.
62. Sample preparation in biological mass spectrometry. A.R. Ivanov, A.V. Lazarev, Eds, Springer: Dordrecht, **2011**.
63. Rapid characterization of microorganisms by mass spectrometry. C. Fenselau, P. Demirev, Eds, ACS Publishing: Washington, **2011** (*ACS Symp. Ser.*, Vol. 1065).
64. *B.M. Ham*. Proteomics of biological systems. Protein phosphorylation using mass spectrometry techniques. Wiley: Hoboken, **2011**.
65. Characterization of impurities and degradants using mass spectrometry. B.N. Pramanik, M.S. Lee, G. Chen, Eds, Wiley: Hoboken, **2011**.
66. Platelet proteomics. Principles, analysis, and applications. A. Garcia, Y.A. Senis, Eds, Wiley: Hoboken, **2011**.
67. Chemical analysis of antibiotic residues in food. J. Wang, J.D. MacNeil, J.F. Kay, Eds, Wiley: Hoboken, **2012**.
68. Mass spectrometry in polymer chemistry. C. Barner-Kowollik, T. Gruending, J. Falkenhagen, S. Weidner, Eds, Wiley: Weinheim, **2012**.
69. Characterization of protein therapeutics using mass spectrometry. G. Chen, Ed., Springer: NY, **2013**.
70. Foodomics. Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition. A. Cifuentes, Ed., Wiley: Hoboken, **2013**.
71. Cluster secondary ion mass spectrometry. Principles and applications. C.M. Mahoney, Ed., Wiley: Hoboken, **2013**.
72. Mass spectrometry for drug discovery and drug development. W.A. Korfmacher, Ed., Wiley: Hoboken, **2013**.
73. *I. Eidhammer, H. Barsnes, G.E. Eide, L. Martens*. Computational and statistical methods for protein quantification by mass spectrometry. Wiley: Chichester, **2013**.
74. Mass spectrometry data analysis in proteomics. R. Matthiesen, Ed., Humana Press/Springer: NY, **2013** (*Meth. Mol. Biol.*, Vol. 1007).
75. *H. Wei*. Studying cell metabolism and cell interactions using microfluidic devices coupled with mass spectrometry. Springer: Heidelberg, **2013**.

76. Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry. Evaluation and applications in food analysis. M. Naushad, M.R. Khan, Eds, CRC Press: Boca Raton, **2014**.
77. **Некоторые онлайн-источники по масс-спектрометрии:**  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry)  
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspecmenu.html#top>  
[http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms\\_toc.php](http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_toc.php)  
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm>  
<http://www.chem.arizona.edu/massspec/>  
<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>  
<http://www.asms.org/about/about-mass-spectrometry>
78. *M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp* Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.*, **1985**, 57 (14), 2935–2939.
79. *K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida* Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Proc. Second Japan–China Joint Symp. Mass. Spectrom.*, **1987**, 184–188.
80. *K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida* Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **1988**, 2 (8), 151–153.
81. *M. Karas, F. Hillenkamp* Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60 (20), 2299–2301.
82. *B. Spengler, R.J. Cotter* Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectroscopy of proteins above 10 000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis. *Anal. Chem.*, **1990**, 62 (8), 793–796.
83. *M. Karas, F. Hillenkamp* Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, 200 (1/3), 71–77.
84. *K. Tanaka* The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42 (33), 3860–3870.
85. *W.C. Chang, L.C.L. Huang, Y.-S. Wang, W.-P. Peng, H.C. Chang, N.Y. Hsu, W.B. Yang, C.H. Chen* Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 582 (1), 1–9.
86. *J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, 246 (4926), 64–71.
87. *J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse* Electrospray ionization – principles and practice. *Mass Spec. Rev.*, **1990**, 9 (1), 37–70.
88. *M. Mann* Electrospray: its potential and limitations as an ionization method for biomolecules. *Org. Mass Spec.*, **1990**, 25 (11), 575–587.
89. *J.B. Fenn* Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42 (33) 3871–3894.
90. *L. Konermann, E. Ahadi, A.D. Rodriguez, S. Vahidi* Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (1), 2–9.
91. *R.J. Anseregg* Derivatization in mass spectrometry: strategies for controlling

- fragmentation. *Mass Spec. Rev.*, **1988**, 7 (4), 395–424.
92. K.D.W. Roth, Z.-H. Huang, N. Sadagopan, J.T. Watson Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.*, **1998**, 17 (4), 255–274.
  93. J.M. Halket, V.G. Zaikin Derivatization in mass spectrometry. 1. Silylation. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 9 (1), 1–21.
  94. V.G. Zaikin, J.M. Halket Derivatization in mass spectrometry. 2. Acylation. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 9 (5), 421–434.
  95. J.M. Halket, V.G. Zaikin Derivatization in mass spectrometry. 3. Alkylation (arylation). *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 10 (1), 1–19.
  96. V.G. Zaikin, J.M. Halket Derivatization in mass spectrometry. 4. Formation of cyclic derivatives. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 10 (5), 555–568.
  97. J.M. Halket, V.G. Zaikin Derivatization in mass spectrometry. 5. Specific derivatization of monofunctional compounds. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2005**, 11 (1), 127–160.
  98. V.G. Zaikin, J.M. Halket Derivatization in mass spectrometry. 6. Formation of mixed derivatives of polyfunctional compounds. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2005**, 11 (6), 611–636.
  99. J.M. Halket, D. Waterman, A.M. Przyborowska, R.K.P. Patel, P.D. Fraser, P.M. Bramley Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.*, **2005**, 56 (410), 219–243.
  100. J.M. Halket, V.G. Zaikin Derivatization in mass spectrometry. 7. On-line derivatization/degradation. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 12 (1), 1–13.
  101. V.G. Zaikin, J.M. Halket Derivatization in mass spectrometry. 8. Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 12 (2), 79–115.
  102. R.S. Borisov, V.G. Zaikin Derivatization of synthetic polymers in mass spectrometric studies. *J. Anal. Chem.*, **2010**, 65 (12), 1423–1435.
  103. T. Santa Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed. Chrom.*, **2010**, 25 (1), 1–10.
  104. Y. Iwasake, Y. Nakano, K. Mochizuki, M. Nomoto, Y. Takahashi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa A new strategy for ionization enhancement by derivatization for mass spectrometry. *J. Chrom. B*, **2011**, 879 (17/18), 1159–1165.
  105. D.J. Harvey Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J. Chrom. B*, **2011**, 879 (17/18), 1196–1225.
  106. A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, R. Rodríguez-Sánchez, M.S. Sanz, I. Ito, K. Martínez-Castro Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J. Chrom. B*, **2011**, 879 (17/18), 1226–1240.
  107. P. Giron, L. Dayon, J.-C. Sanchez Cysteine tagging for MS-based proteomics. *Mass Spectrom. Rev.*, **2011**, 30 (3), 366–395.
  108. F. Xu, L. Zou, Y. Liu, Z. Zhang, C.N. Ong Enhancement of the capabilities of liquid chromatography – mass spectrometry with derivatization: general principles and applications. *Mass Spectrom. Rev.*, **2011**, 30 (6), 1143–1172.
  109. P. Deng, Y. Zhan, X. Chen, D. Zhong Derivatization methods for quantitative bioanalysis by LC–MS/MS. *Bioanalysis*, **2012**, 4 (1), 49–69.
  110. Q. Xiao-Qiang, W. Rui, Z. Li-Hua, Y. Geng-Liang, Z. Yu-Kui Recent advancement of chemical derivatization and its applications to high sensitive analysis of peptide in mass spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2012**, 40 (7), 1123–1129.

111. T. Toyo'oka LC–MS determination of bioactive molecules based upon stable isotope-coded derivatization method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 69 (1), 174–184.
112. C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras Liquid chromatography coupled to on-line post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 798 (1), 1–24.
113. E. Lattová, H. Perreault The usefulness of hydrazine derivatives for mass spectrometric analysis of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.*, **2013**, 32 (5), 366–385.
114. I. Athanasiadou, Y.S. Angelis, E. Lyris, C. Georgakopoulos Chemical derivatization to enhance ionization of anabolic steroids in LC-MS for doping-control analysis. *Tr. Anal. Chem.*, **2013**, 42 (1), 137–156.
115. F.B. Erim Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Tr. Anal. Chem.*, **2013**, 52 (1), 239–247.
116. N. Bergman, D. Shevchenko, J. Bergquist Approaches for the analysis of low molecular weight compounds with laser desorption/ionization techniques and mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406 (1), 49–61.
117. S.B. Wall, M.R. Smith, K. Ricart, F. Zhou, P.K. Vayalil, J.-Y. Oh, A. Landar Detection of electrophile-sensitive proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1840 (2), 913–922.
118. K.L. Busch Derivatization in mass spectrometry. *Spectroscopy*, **2010**, 25 (11), 18–22.
119. S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnol.*, **1999**, 17 (10), 994–999.
120. M. Sethuraman, M.E. McComb, H. Huang, S. Huang, T. Heibeck, C.E. Costello, R.A. Cohen Isotope-coded affinity tag (ICAT) approach to redox proteomics: identification and quantitation of oxidant-sensitive cysteine thiols in complex protein mixtures. *J. Proteome Res.*, **2004**, 3 (6), 1228–1233.
121. E.C. Yi, X. Li, K. Cooke, H. Lee, B. Raught, A. Page, V. Aneliunas, P. Hieter, D.R. Goodlett, R. Aebersold Increased quantitative proteome coverage with  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme. *Proteomics*, **2005**, 5 (2), 380–387.
122. A. Guaragna, A. Amoresano, V. Pinto, G. Monti, G. Mastrobuoni, G. Marino, G. Palumbo Synthesis and proteomic activity evaluation of a new isotope-coded affinity tagging (ICAT) reagent. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19 (5), 1095–1104.
123. K. Biemann, S.A. Martin Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins. *Mass Spectrom. Rev.*, **1987**, 6 (1), 1–76.
124. M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaave, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, M. Mann Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, **1996**, 379 (6564), 466–469.
125. A.P. Jonsson Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, 58 (7), 868–884.
126. K. Medzihradszky Peptide sequence analysis. *Meth. Enzymol.*, **2005**, 402, 209–244.
127. K. Артеменко, Т. Самгина, А. Лебедев Масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование пептидов. *Масс-спектрометрия*, **2006**, 3 (4), 225–254.
128. J. Seidler, N. Zinn, M.E. Boehm, W.D. Lehmann *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics*, **2010**, 10 (4), 634–649.

129. X. Qiao, X. Qin, D. She, R. Wang, X. Zang, L. Zhang, Y. Zhang Mass spectrometry-based tag and its application to high efficient peptide analysis – A review. *Talanta*, **2014**, *126*, 91–102.
130. E. Krause, H. Wenschuh, P.R. Jungblut The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal. Chem.*, **1999**, *71* (19), 4160–4165.
131. J.R. Kimmel Guanidination of proteins. *Meth. Enzymol.*, **1967**, *11*, 584–589.
132. D.M. Bunk, R.D. Macfarlane Derivatization to enhance sequence-specific fragmentation of peptides and proteins. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1993**, *126*, 123–136.
133. V. Bonetto, A.-C. Bergman, H. Jörnvall, R. Sillard C-terminal sequence analysis of peptides and proteins using carboxypeptidases and mass spectrometry after derivatization of Lys and Cys residues. *Anal. Chem.*, **1997**, *69* (7), 1315–1319.
134. J.E. Hale, J.P. Butler, M.D. Knierman, G.W. Becker Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Anal. Biochem.*, **2000**, *287* (1), 110–117.
135. F.L. Brancia, S.G. Oliver, J.J. Gaskell Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14* (21), 2070–2073.
136. R.L. Beardsley, J.A. Karty, J.P. Reilly Enhancing the intensities of lysine-terminated tryptic peptide ions in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14* (23), 2147–2153.
137. T. Keough, M.P. Lacey, R.S. Youngquist Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsource decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14* (24), 2348–2356.
138. R.L. Beardsley, J.P. Reilly Optimization of guanidination procedures for MALDI mass mapping. *Anal. Chem.*, **2002**, *74* (8), 1884–1890.
139. S. Warwood, S. Mohammed, I.M. Cristea, C. Evans, A.D. Whetton, S.J. Gaskell Guanidination chemistry for qualitative and quantitative proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, *20* (21), 3245–3256.
140. H. Han, S. Nho, A. Lee, J. Kim Effects of guanidination with trypsin, Lys-C, or Glu-C digestion on mass spectrometric signal intensity and protein sequence coverage. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2010**, *31* (6), 1527–1534.
141. J.-S. Kim, J.-S. Song, Y. Kim, S.B. Park, H.-J. Kim De novo analysis of protein N-terminal sequence utilizing MALDI signal enhancing derivatization with Br signature. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *402* (5), 1911–1919.
142. M.R. Baker, Q.X. Li Guanidination of tryptic peptides without desalting for matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry analysis. *Anal. Chem.*, **2013**, *85* (18), 8873–8880.
143. E.C. Peters, D.M. Horn, D.C. Tully, A. Brock A novel multifunctional labeling reagent for enhanced protein characterization with mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15* (24), 2387–2392.
144. M. Cindrić, T. Čepo, A. Škrilin, M. Vuletić, L. Bindila Accelerated on-column lysine derivatization and cysteine methylation by imidazole reaction in a deuterated environment for enhanced product ion analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, *20* (4), 694–

702.

145. A. Horvatić, I. Dodig, T. Vuletić, D. Pavoković, A. Butorac, M. Cindrić Comparison between enhanced MALDI in-source decay by ammonium persulfate and N- or C-terminal derivatization methods for detailed peptide structure determination. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (8), 3940–3947.
146. D.A. Kidwell, M.M. Ross, R.J. Colton Sequencing of peptides by secondary ion mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106 (7), 2219–2220.
147. D.A. Kidwell, M.M. Ross, R.J. Colton Sequencing of peptides by SIMS from the C or N terminus. In: Secondary ion mass spectrometry. SIMS IV. *Springer Ser. Chem. Phys.*, **1984**, 36, 412–414.
148. J.E. Vath, K. Biemann Microderivatization of peptides by placing a fixed positive charge at the N-terminus to modify high energy collision fragmentation. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1990**, 100 (1), 287–299.
149. J.T. Stults, J. Lai, S. McCune, R. Wetzel Simplification of high-energy collision spectra of peptides by amino-terminal derivatization. *Anal. Chem.*, **1993**, 65 (13), 1703–1708.
150. J. Zaia, K. Biemann Comparison of charged derivatives for high energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, 6 (5), 428–436.
151. A.R. Dongré, J.L. Jones, Á. Somogyi, V.H. Wysoki Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118 (35), 8365–8374.
152. M.J. Deery, S.G. Summerfield, A. Buzy, K.R. Jennings A Mechanism for the loss of 60 u from peptides containing an arginine residue at the C-terminus. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, 8 (3), 253–261.
153. A.S. Danell, G.L. Glish Evidence for ionization-related conformational differences of peptide ions in a quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12 (12), 1331–1338.
154. C. Poon, H. Kaplan, P.M. Mayer Methylating peptides to prevent adduct ion formation also directs cleavage in collision-induced dissociation mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 10 (1), 39–46.
155. M. Cydzik, M. Rudowska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk Derivatization of peptides as quaternary ammonium salts for sensitive detection by ESI-MS. *J. Pept. Sci.*, **2011**, 17 (6), 445–453.
156. M. Rudowska, R. Wieczorek, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk Gas-phase fragmentation of oligoproline peptide ions lacking easily mobilizable protons. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, 24 (6), 846–856.
157. R. Bąchor, P. Mielczarek, M. Rudowska, J. Silberring, Z. Szewczuk Sensitive detection of charge derivatized peptides at the attomole level using nano-LC-ESI-MRM-analysis. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2014**, 362, 32–38.
158. B. Setner, M. Radulowska, E. Klem, M. Cebrat, Z. Szewczuk Peptides derivatized with bicyclic quaternary ammonium salts. Sequencing via tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2014, 49 (10), 995–1001.
159. M. Bartlet-Jones, W.A. Jeffery, H.F. Hansen, D.J.C. Pappin Peptide ladder sequencing by mass spectrometry using a novel, volatile degradation reagent. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8 (9), 737–742.
160. B. Spengler, F. Luetzenkirchen, S. Metzger, P. Chaurand, R. Kaufmann, W. Jeffery,

- M. Bartlet-Jones, D.J.C. Pappin* Peptide sequencing of charged derivatives by postsource decay MALDI mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1997**, 169/170, 127–140.
161. *R. Zhang, C.S. Sioma, R.A. Thompson, L. Xiong, F.E. Regnier* Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics. *Anal. Chem.*, **2002**, 74 (15), 3662–3669.
162. *H. Mirzaei, F. Regnier* Enhancing electrospray ionization efficiency of peptides by derivatization. *Anal. Chem.*, **2006**, 78 (12), 4175–4183.
163. *C. Morano, X. Zhang, L.D. Fricker* Multiple isotopic labels for quantitative mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2008**, 80 (23), 9298–9309.
164. *M. Zimnicka, C.L. Moss, T.W. Chung, R. Hui, F. Tureček* Tunable charge tags for electron-based methods of peptide sequencing: design and applications. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, 23 (4), 608–620.
165. *G. Ferenc, P. Pádár, T. Janáky, Z. Szabó, G.K. Tóth, L. Kovács, Z. Kele* Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry of bromine-containing charged derivatives of peptides. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1159 (1/2), 119–124.
166. *D.S. Wagner, A. Salari, D.A. Gage, J. Leykam, J. Fetter, R. Hollingsworth, J.T. Watson* Derivatization of peptides to enhance ionization efficiency and control fragmentation during analysis by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, **1991**, 20 (7), 419–425.
167. *J.T. Watson, D.S. Wagner, Y.-S. Chang, J.R. Strahler, S.M. Hanash, D.A. Gage* Characterization of the ethyl-triphenylphosphonium derivative of model peptides by fast atom bombardment collisionally-activated dissociation tandem mass spectrometry using B/E linked scans. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1991**, 111, 191–209.
168. *Y.-S. Chang, D.A. Gage, J.T. Watson* Charge-remote fragmentation in a disulfide-containing peptide, pen 1-enkephalin, under fast atom bombardment collisionally activated dissociation conditions. *Biol. Mass Spectrom.*, **1993**, 22 (3), 176–180.
169. *Z.-H. Huang, J. Wu, K.D.W. Roth, Y. Yang, D.A. Gage, J.T. Watson* A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **1997**, 69 (2), 137–144.
170. *P.-C. Liao, Z.-H. Huang, J. Allison* Charge remote fragmentation of peptides following attachment of a fixed positive charge: a matrix-assisted laser desorption/ionization postsource decay study. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, 8 (5), 501–509.
171. *Z.-H. Huang, T. Shen, J. Wu, D.A. Gage, J.T. Watson* Protein sequencing by matrix-assisted laser desorption ionization–postsource decay–mass spectrometry analysis of the *N*-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine-acetylated tryptic digests. *Anal. Biochem.*, **1999**, 268 (2), 305–317.
172. *M. Adamczyk, J.C. Gebler, J. Wu* Charge derivatization of peptides to simplify their sequencing with an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13 (14), 1413–1422.
173. *N. Sadagopan, J.T. Watson* Investigation of the tris(trimethoxyphenyl)phosphonium acetyl charged derivatives of peptides by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, 11 (2), 107–119.
174. *T.L. Shen, J. Allison* Interpretation of matrix-assisted laser desorption/ionization postsource decay spectra of charge-derivatized peptides: some examples of tris[(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium]-tagged proteolytic digestion products of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, 11 (2), 145–152.

175. X. Czeszak, W. Morelle, G. Ricart, D. Tétaert, J. Lemoine Localization of the O-glycosylated sites in peptides by fixed-charge derivatization with a phosphonium group. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (15), 4320–4324.
176. A. Pashkova, H.-S. Chen, T. Rejtar, X. Zang, R. Giese, V. Andreev, E. Moskovets, B.L. Karger Coumarin tags for analysis of peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 2. Alexa Fluor 350 tag for increased peptide and protein identification by LC-MALDI-TOF/TOF MS. *Anal. Chem.*, **2005**, 77 (7), 2085–2096.
177. A. Karnezis, C.K. Barlow, R.A.J. O’Hair, W.D. McFadyen Peptide derivatization as a strategy to form fixed-charge peptide radicals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20 (19), 2865–2870.
178. W. Chen, P.J. Lee, H. Shion, N. Ellor, J.C. Gebler Improving de novo sequencing of peptides using a charged tag and C-terminal digestion. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (4), 1583–1590.
179. H. Kuyama, K. Sonomura, O. Nishimura, S. Tsunasawa A method for N-terminal de novo sequence analysis of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **2008**, 380 (2), 291–296.
180. H. Kuyama, K. Shima, K. Sonomura, M. Yamaguchi, E. Ando, O. Nishimura, S. Tsunasawa A simple and highly successful C-terminal sequence analysis of proteins by mass spectrometry. *Proteomics*, **2008**, 8 (8), 1539–1550.
181. Y.-R. Chiang, W. Ismail, S. Gallien, D. Heintz, A. Van Dorsselaer, G. Fuchs Cholest-4-en-3-one- $\Delta^1$ -dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, 74 (1), 107–113.
182. J. Franck, M. El Ayed, M. Wisztorski, M. Salzet, I. Fournier On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies. *Anal. Chem.*, **2009**, 81 (20), 8305–8317.
183. S. Gallien, E. Perrodou, C. Carapito, C. Deshayes, J.-M. Reyrat, A. Van Dorsselaer, O. Poch, C. Schaeffer, O. Lecompte Ortho-proteogenomics: multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol. *Genome Res.*, **2009**, 19 (1), 128–135.
184. M. Baudet, P. Ortet, J.-C. Gaillard, B. Fernandez, P. Guérin, C. Enjalbal, G. Subra, A. de Groot, M. Barakat, A. Dedieu, J. Armengaud Proteomics-based refinement of deinococcus deserti genome annotation reveals an unwonted use of non-canonical translation initiation codons. *Genome Res.*, **2009**, 19 (1), 128–135.
185. H. Kuyama, C. Nakajima, T. Nakazawa, O. Nishimura Enzymatic conversion of arginine to citrulline for improving fragmentation of  $N^{\alpha}$ -tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium-acetylated peptides by tandem mass spectrometry. *Anal. Meth.*, **2011**, 3 (12), 2829–2835.
186. H.J. Yoo, N. Wang, S. Zhuang, H. Song, K. Håkansson Negative-ion electron capture dissociation: radical-driven fragmentation of charge-increased gaseous peptide anions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133 (42), 16790–16793.
187. H. Kuyama, C. Nakajima, K. Tanaka Enriching C-terminal peptide from endopeptidase ArgC digest for protein C-terminal analysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22 (23), 7163–7168.
188. Y. He, R. Parthasarathi, K. Raghavachari, J.P. Reilly Photodissociation of charge tagged peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, 23 (7), 1182–1190.
189. M. An, X. Zou, Q. Wang, X. Zhao, J. Wu, L.-M. Xu, H.-Y. Shen, X. Xiao, D. He, J. Ji High-confidence de novo peptide sequencing using positive charge derivatization and tandem

- MS spectra merging. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (9), 4530–4537.
190. D. Bertaccini, S. Vaca, C. Carapito, F. Arsène-Ploetze, A. Van Dorsselaer, C. Schaeffer-Reiss An improved stable isotope N-terminal labeling approach with light/heavy TMPP to automate proteogenomics data validation: dN-TOP. *J. Proteome Res.*, **2013**, 12 (6), 3063–3070.
  191. C. Bland, L. Bellanger, J. Armengaud Magnetic immunoaffinity enrichment for selective capture and MS/MS analysis of N-terminal-TMPP-labeled peptides. *J. Proteome Res.*, **2014**, 13 (2), 668–680.
  192. C. Bland, E.M. Hartmann, J.A. Christie-Oleza, B. Fernandez, J. Armengaud N-Terminal-oriented proteogenomics of the marine bacterium *Roseobacter denitrificans* Och114 using N-succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP) labeling and diagonal chromatography. *Mol. Cell. Proteomics*, **2014**, 13 (5), 1369–1381.
  193. D. Ayoub, D. Bertaccini, H. Diemer, E. Wagner-Rousset, O. Colas, S. Cianferani, A. Van Dorselaer, A. Beck, C. Schaeffer-Reiss Characterization of the N-terminal heterogeinties of monoclonal antibodies using in-gel charge derivatization of  $\alpha$ -amines and LC-MS/MS. *Anal. Chem.*, **2015**, 87 (7), 3784–3790.
  194. H. Shen, M. An, X. Zou, X. Zhao, Q. Wang, G. Xing, J. Ji Evaluation of the accuracy of protein quantification using isotope TMPP-labeled peptides. *Proteomics*, **2015**, 15 (17), 2903–2909.
  195. N. DeGraan-Weber, J. Zhang, J.P. Reilly Distinguishing aspartic and isoaspartic acids in peptides by several mass spectrometric fragmentation methods. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2016**, 27 (12), 2041–2053.
  196. M. Kullolli, D.A. Rock, J. Ma Immuno-affinity capture followed by TMPP N-terminus tagging to study catabolism of therapeutic proteins. *J. Proteome Res.*, **2017**, 16 (2), 911–919.
  197. S.E. Calvo, O. Julien, K.R. Clauser, H. Shen, K.J. Kamer, J.A. Wells, V.K. Mootha Comparative analysis of mitochondrial N-termini from mouse, human, and yeast. *Mol. Cell. Proteomics*, **2017**, doi: 10.1074/mcp.M116.063818.
  198. B.W. Laursen, F.C. Krebs, M.F. Nielsen, K. Bechgaard, J.B. Christensen, N. Harrit 2,6,10-Tris(dialkylamino)trioxatriangulenium ions. synthesis, structure, and properties of exceptionally stable carbenium ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120 (47), 12255–12263.
  199. B.W. Laursen, J. Reynisson, K.V. Mikkelsen, K. Bechgaard, N. Harrit 2,6,10-Tris(dialkylamino)trioxatriangulenium salts: a new promising fluorophore. Ion-pair formation and aggregation in non-polar solvents. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4 (8), 568–576.
  200. B.W. Laursen, T.J. Sørensen Synthesis of super stable triangulenium dye. *J. Org. Chem.*, **2009**, 74 (8), 3183–3185.
  201. C. Denekamp, J. Lacour, B. Laleu, E. Rabkin Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)methyl carbenium ion for charge derivatization of amines and amino acids. *J. Mass Spectrom.*, **2008**, 43 (5), 623–627.
  202. A.V. Ustinov, V.V. Shmanai, K. Patel, I.A. Stepanova, I.A. Prokhorenko, I.V. Astakhova, A.D. Malakhov, M.V. Skorobogaty, P.L. Bernad, Jr, S. Khan, M. Shahgholi, E.M. Southern, V.A. Korshun, M.S. Shchepinov Reactive trityl derivatives: stabilised carbocation mass-tags for life sciences applications. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6 (24), 4593–4608.
  203. T. Keough, R.S. Youngquist, M.P. Lacey A method for high-sensitivity peptide sequencing

- using postsource decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, 96 (13), 7131–7136.
204. U. Hellman, R. Bhikhabhai Easy amino acid sequencing of sulfonated peptides using post-source decay on a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer equipped with a variable voltage reflector. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16 (19), 1851–1859.
205. J. Flensburg, M. Belew Characterization of recombinant human serum albumin using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1009 (1/2), 111–117.
206. A. Pashkova, E. Moskovets, B.L. Karger Coumarin tags for improved analysis of peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 1. Enhancement in MALDI MS signal intensities. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (15), 4550–4557.
207. J.R. Stutzman, S.A. McLuckey Ion/ion reactions of MALDI-derived peptide ions: increased sequence coverage via covalent and electrostatic modification upon charge inversion. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (24), 10679–10685.
208. J.E. Vath, M. Zollinger, K. Biemann Method for the derivatization of organic compounds at the sub-nanomole level with reagent vapor. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1988**, 331 (3/4), 248–252.
209. B.L. Frey, D.T. Lador, S.B. Sondalle, C.J. Krusemark, A.L. Jue, J.J. Coon, L.M. Smith Chemical derivatization of peptide carboxyl groups for highly efficient electron transfer dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, 24 (11), 1710–1721.
210. X. Qiao, Y. Zhou, C. Hou, X. Zhang, K. Yang, L. Zhang, Y. Zhang 1-(3-Aminopropyl)-3-butyliimidazolium bromide for carboxyl group derivatization: potential applications in high sensitivity peptide identification by mass spectrometry. *Sci. China Life Sci.*, **2013**, 56 (3), 240–245.
211. C. Nakajima, H. Kuyama, T. Nakazawa, O. Nishimura, S. Tsunasawa A method for N-terminal de novo sequencing of N<sup>α</sup>-blocked proteins by mass spectrometry. *Analyst*, **2011**, 136 (1), 113–119.
212. C. Nakajima, H. Kuyama, K. Tanaka Mass spectrometry-based sequencing of protein C-terminal peptide using  $\alpha$ -carboxyl group-specific derivatization and COOH capturing. *Anal. Biochem.*, **2012**, 428 (2), 167–192.
213. C. Nakajima, H. Kuyama, T. Nakazawa, O. Nishimura C-Terminal sequencing of protein by MALDI mass spectrometry through the specific derivatization of the  $\alpha$ -carboxyl group with 3-aminopropyltris-(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 404 (1), 125–132.
214. I. Lindh, W.J. Griffiths, T. Bergmann, J. Sjövall Electrospray/collision-induced dissociation of derivatised peptides: studies on a hybrid magnetic sector–orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1997**, 164 (1/2), 71–79.
215. I. Lindh, L. Hjelmqvist, T. Bergmann, J. Sjövall, W.J. Griffiths De novo sequencing of proteolytic peptides by a combination of C-terminal derivatization and nano-electrospray/collision-induced dissociation mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, 11 (8), 673–686.
216. M. Masuda, C. Toriumi, T. Santa, K. Imai Fluorogenic derivatization reagents suitable for isolation and identification of cysteine-containing proteins utilizing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (3), 728–735.
217. T. Shimada, H. Kuyama, T.-A. Sato, K. Tanaka Development of iodoacetic acid-based

- cysteine mass tags: Detection enhancement for cysteine-containing peptide by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **2012**, 421 (2), 785–787.
218. *D. Ren, S. Julka, H.D. Inerowicz, F.E. Regnier* Enrichment of cysteine-containing peptides from tryptic digests using a quaternary amine tag. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (15), 4522–4530.
219. *X. Qiao, R. Wang, H. Yan, T. Wang, Q. Zhao, L. Zhang, Y. Zhang* Development of a novel imidazolium-based aromatic quaternary ammonium tag: synthesis and application to the efficient analysis of cysteinyl-peptides by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28 (3) 256–264.
220. *M. Guo, Y. Zhai, C. Guo, Y. Liu, D. Tang, Y. Pan* A new strategy to determine the protein mutation site using matrix-assisted laser desorption ionization in-source decay: derivatization by ionic liquid. *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 865, 31–38.
221. *X. Qiao, Y. Yang, S. Liu, S. Chen, X. Wang, G. Li, H. Yan, X. Yang* Novel pyridinium-based tags: synthesis and characterization for highly efficient analysis of thiol-containing peptides by mass spectrometry. *Analyst*, **2015**, 140 (2), 407–413.
222. *J. Wang, J. Zhang, B. Arbogast, C.S. Maier* Tandem mass spectrometric characterization of thiol peptides modified by the chemoselective cationic sulfhydryl reagent (4-iodobutyl) triphenylphosphonium – effects of a cationic thiol derivatization on peptide fragmentation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2011**, 22 (10), 1771–1783.
223. *O. Burllet, C.Y. Yang, S.J. Gaskell* Influence of cysteine to cysteic acid oxidation on the collision-activated decomposition of drotonated peptides: evidence for intraionic interactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3 (4), 337–344.
224. *T.M. Billeci, J.T. Stults* Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **1993**, 65 (13), 1709–1716.
225. *K.A. Cox, S.J. Gaskell, M. Morris, A. Whiting* Role of the site of protonation in the low-energy decompositions of gas-phase peptide ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1996**, 7 (6), 522–531.
226. *J.R. Cabrera-Pardo, D.I. Chai, S. Liu, M. Mrksich, S.A. Kozmin* Label-assisted mass spectrometry for the acceleration of reaction discovery and optimization. *Nat. Chem.*, **2013**, 5 (5), 423–427.
227. *A. Mandal, A.K. Das, A. Basak* Label-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (LA-LDI-MS): use of pyrene aldehyde for detection of biogenic amines, amino acids and peptides. *RSC Adv.*, **2015**, 5 (129), 106912–106917.
228. *D. Harvey* Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update for 2009–2010. *Mass Spec. Rev.*, **2015**, 34 (3), 268–422.
229. *D. Harvey* Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update for 2005–2006. *Mass Spec. Rev.*, **2011**, 30 (1), 1–100.
230. *E. Lattová, H. Perreault* The usefulness of hydrazine derivatives for mass spectrometric analysis of carbohydrates. *Mass Spec. Rev.*, **2013**, 32 (5), 366–385.
231. *L. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. Deelder, M. Wuhrer* Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397 (8), 3457–3481.
232. *Z. Zhu, H. Desaire* Carbohydrates on proteins: site-specific glycosylation analysis by mass

- spectrometry. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2015**, 8, 463–483.
233. L. Han, C.E. Costello Mass spectrometry of glycans. *Biochemistry (Moscow)*, **2013**, 78 (7), 710–720.
234. M.J. Kailemia, L.R. Ruhaak, C.B. Lebrilla, I.J. Amster Oligosaccharide analysis by mass spectrometry: a review of recent developments. *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (1), 196–212.
235. W. Gao, H. Li, Y. Liu, Y. Liu, X. Feng, B.-F. Liu, X. Liu Rapid and sensitive analysis of N-glycans by MALDI-MS using permanent charge derivatization and methylation. *Talanta*, **2016**, 161, 554–559.
236. J.Z. Min, K. Nagai, Q. Shi, W. Zhou, K. Todoroki, K. Inoue, Y.-I. Lee, T. Toyo'oka Highly sensitive derivatization reagents possessing positively charged structures for the determination of oligosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B*, **2016**, 1465, 79–89.
237. L. Likhoshervostov, O. Novikova, V. Derevitskaya, N. Kochetkov A new simple synthesis of amino sugar  $\beta$ -D-glycosylamines. *Carbohydr. Res.*, **1986**, 146 (1), C1–C5.
238. X. Liu, G. Zhang, K. Chan, J. Li Microwave-assisted Kochetkov amination followed by permanent charge derivatization: a facile strategy for glycomics. *Chem. Comm.*, **2010**, 46 (39), 7424–7426.
239. S.A. Johannesen, S.R. Beeren, D. Blank, B.Y. Yang, R. Geyer, O. Hindsgaul Glycan analysis via derivatization with a fluorogenic pyrylium dye. *Carbohydr. Res.*, **2012**, 352, 94–100.
240. Y. Cai, Y. Zhang, P. Yang, H. Lu Improved analysis of oligosaccharides for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using aminopyrazine as a derivatization reagent and co-matrix. *Analyst*, **2013**, 138 (21), 6270–6276.
241. W. Tong, H. Han, Z. Song, C. Ma, Y. Pan, Y. Zhang, W. Qin, X. Qian Chemical derivatization with a polycyclic aromatic hydrocarbon for highly sensitive detection of N-linked glycans using MALDI-TOF MS. *Anal. Meth.*, **2012**, 4 (11), 3531–3535.
242. S. Bank, E. Heller, E. Memmel, J. Seibel, U. Holzgrabe, P. Kapkova Matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry of N-glycans derivatized with isonicotinic hydrazide and its biotinylated form. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, 28 (15), 1745–1756.
243. K. Kim, Y. Kim, C. Hwang, H. Park, Y. Yang, M. Koo, Y. Kim A MALDI-MS-based quantitative targeted (MALDI-QTaG) for total N-glycan analysis. *Biotechnol. Lett.*, **2015**, 37 (10), 2019–2025.
244. T.J.P. Naven, D.J. Harvey Cationic derivatization of oligosaccharides with Girard's T reagent for improved performance in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10 (7), 829–834.
245. J.W. Gouw, P.C. Bugers, M.A. Trikoupi, J.K. Terlouw Derivatization of small oligosaccharides prior to analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization using glycidyltrimethylammonium chloride and Girard's reagent T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16 (10), 905–912.
246. Y.-G. Kim, J.Y. Oh, G.-C. Gil, M.K. Kim, J.H. Ko, S. Lee, H.J. Lee, W.R. Wee, B.-G. Kim Identification of  $\alpha$ -Gal and non-Gal epitopes in pig corneal endothelial cells and keratocytes by using mass spectrometry. *Curr. Eye Res.*, **2009**, 34 (10), 877–895.
247. M.S. Bereman, D.L. Comins, D.C. Muddiman Increasing the hydrophobicity and electrospray response of glycans through derivatization with novel cationic hydrazides.

- Curr. Eye Res.*, **2010**, 46 (2), 237–239.
248. C. Wang, Z. Wu, J. Yuan, B. Wang, P. Zhang, Y. Zhang, Z. Wang, L. Huang Simplified quantitative glycomics using the stable isotope label Girard's reagent P by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Prot. Res.*, **2013**, 13 (2), 372–384.
249. A. Kameyama, Y. Kaneda, H. Yamanaka, H. Yoshimine, H. Narimatsu, Y. Shinohara Detection of oligosaccharides labeled with cyanine dyes using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (15), 4537–4542.
250. Y. Zhang, T. Iwamoto, G. Radke, Y. Kariya, K. Suzuki, A.H. Conrad, J.M. Tomich, G.W. Conrad On-target derivatization of keratan sulfate oligosaccharides with pyrenebutyric acid hydrazide for MALDI-TOF/TOF-MS. *J. Mass Spectrom.*, **2008**, 43 (6), 765–772.
251. J. Gao, D.A. Thomas, C.H. Sohn, J.L. Beauchamp Biomimetic reagents for the selective free radical and acid–base chemistry of glycans: application to glycan structure determination by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (29), 10684–10692.
252. H. Hahne, P. Neubert, K. Kuhn, C. Etienne, R. Bomgarden, J.C. Rogers, B. Kuster Carbonyl-reactive tandem mass tags for the proteome-wide quantification of N-linked glycans. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (8), 3716–3724.
253. M. Kijewska, A. Kuc, A. Kluczyk, M. Waliczek, A. Man-Kupisinska, J. Lukasiewicz, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk Selective detection of carbohydrates and their peptide conjugates by ESI-MS using synthetic quaternary ammonium salt derivatives of phenylboronic acids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2014**, 25 (6), 966–976.
254. S. Endo, M. Morita, M. Ueno, T. Maeda, T. Terabayashi Fluorescent labeling of a carboxyl group of sialic acid for MALDI-MS analysis of sialyloligosaccharides and ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2009**, 378 (4) 890–894.
255. J. Amano, T. Nishikaze, F. Tougasaki, H. Jinmei, I. Sugimoto, S. Sugawara, M. Fujita, K. Osumi, M. Mizuno Derivatization with 1-pyrenyldiazomethane enhances ionization of glycopeptides but not peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2010**, 82 (20), 8738–8743.
256. Z. Schug, C. Frezza, L. Galbraith, E. Gottlieb The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. *Acta Oncol.*, **2012**, 51 (3), 301–310.
257. J.G. Bollinger, W. Thompson, Y. Lai, R.C. Oslund, T.S. Hallstrand, M. Sadilek, F. Turecek, M.H. Gelb Improved sensitivity mass spectrometric detection of eicosanoids by charge reversal derivatization. *Anal. Chem.*, **2010**, 82 (16), 6790–6796.
258. X. Liu, S.H. Moon, D.J. Mancuso, C.M. Jenkins, S. Guan, H.F. Sims, R.W. Gross Oxidized fatty acid analysis by charge-switch derivatization, selected reaction monitoring, and accurate mass quantitation. *Anal. Biochem.*, **2013**, 442, 40–50.
259. R.V.V. Tatituri, B.J. Wolf, M.B. Brenner, J. Turk, F.-F. Hsu Characterization of polar lipids of *Listeria monocytogenes* by HCD and low-energy CAD linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407 (9), 2519–2528.
260. J.G. Bollinger, G. Rohan, M. Sadilek, M.H. Gelb LC/ESI-MS/MS detection of FAs by charge reversal derivatization with more than four orders of magnitude improvement in sensitivity. *J. Lipid Res.*, **2013**, 54 (12), 3523–3530.
261. K. Yang, B.G. Dilthey, R.W. Gross Identification and quantitation of fatty acid double bond positional isomers: a shotgun lipidomics approach using charge-switch derivatization. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (20), 9742–9750.

262. S.W. Meckelmann, S. Hellhake, M. Steuck, M. Krohn, N.H. Schebb Comparison of derivatization/ionization techniques for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxylipins. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, **2017**, 130, 8–15.
263. M. Wang, R.H. Han, X. Han Fatty Acidomics: Global analysis of lipid species containing a carboxyl group with a charge-remote fragmentation-assisted approach. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (19), 9312–9320.
264. Y. Mochizuki, S. Inagaki, M. Suzuki, J.Z. Min, K. Inoue, K. Todoroki, T. Toyo'oka A novel derivatization reagent possessing a bromoquinolinium structure for biological carboxylic acids in HPLC-ESI-MS/MS. *J. Sep. Sci.*, **2013**, 36 (12), 1883–1889.
265. Y. Xu, L. Zhang, H. Lu, P. Yang Mass spectrometry analysis of phosphopeptides after peptide carboxy group derivatization. *Anal. Chem.*, **2008**, 80 (21), 8324–8328.
266. J. Leng, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, H. Wang, Y. Guo A highly sensitive isotope-coded derivatization method and its application for the mass spectrometric analysis of analytes containing the carboxyl group. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 758, 114–121.
267. J. Leng, Q. Guan, T. Sun, H. Wang, J. Cui, Q. Liu, Z. Zhang, M. Zhang, Y. Guo Direct infusion electrospray ionization–ion mobility–mass spectrometry for comparative profiling of fatty acids based on stable isotope labeling. *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 887, 148–154.
268. T. Zhou, J. Leng, Y. Peng, L. Zhang, Y. Guo Mass spectrometric analysis of free fatty acids in infant milk powders by frozen pretreatment coupled with isotope-labeling derivatization. *J. Sep. Sci.*, **2016**, 39 (5), 148–154.
269. T. Hu, C. Tie, Z. Wang, J.-L. Zhang Highly sensitive and specific derivatization strategy to profile and quantitate eicosanoids by UPLC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, 950, 108–118.
270. Y.-Q. Huang, J.-Q. Liu, H. Gong, J. Yang, Y. Li, Y.-Q. Feng Use of isotope mass probes for metabolic analysis of the jasmonate biosynthetic pathway. *Analyst*, **2011**, 136 (7), 1515–1522.
271. H. Wang, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, X. Zhuo, Y. Huang, Y. Guo Comparison of hair fatty alcohols by *N*-alkylpyridinium isotope quaternization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for drug abuse monitoring. *Chin. J. Chem.*, **2012**, 30 (10), 2376–2382.
272. H. Wang, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, J. Leng, T. Cai, Y. Guo *N*-alkylpyridinium quaternization for assisting electrospray ionization of sterols in oil by quadrupole-time of flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2013**, 48 (10), 1101–1108.
273. Y. Cao, Q. Guan, T. Sun, H. Wang, J. Leng, Y. Guo *N*-alkylpyridinium quaternization combined with liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry: A highly sensitive method to quantify fatty alcohols in thyroid tissues. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 849, 19–26.
274. S. Svane, V. Gorshkov, F. Kjeldsen Charge inversion of phospholipids by dimetal complexes for positive ion-mode electrospray ionization mass spectrometry analysis. *Anal. Chem.*, **2015**, 87 (17), 8732–8739.
275. H. Wang, Z. Zhao, Y. Guo Chemical and biochemical applications of MALDI TOF-MS based on analyzing the small organic molecules. *Top. Curr. Chem.*, **2013**, 331, 165–192.
276. A. Tholey, C. Wittmann, M.-J. Kang, D. Bungert, K. Hollemeyer, E. Heinzle Derivatization of small biomolecules for optimized matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2002**, 37 (9), 963–973.

277. Y. Yao, P. Wang, R. Giese Evaporative derivatization of phenols with 2-sulfobenzoic anhydride for detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, 28 (6), 653–661.
278. R. Borisov, D. Zhilyaev, N. Polovkov, V. Zaikin Simple approach to derivatization of alcohols and phenols for the analysis by matrix(surface)-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, 28 (21), 2231–2236.
279. P. Борисов, Н. Половков, Д. Жиляев, В. Заикин Простой и удобный подход к дериватизации спиртов для исследования для исследования методами масс-спектрометрии методами с «мягкой» ионизацией. *Масс-спектрометрия*, **2014**, 11 (2), 113–117.
280. P. Wang, Q. Zhang, Y. Yao, R.W. Giese Cationic xylene tag for increasing sensitivity in mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2015**, 26 (10), 1713–1721.
281. J.F. Lui, J. Ding, B.F. Yuan, Y.Q. Feng Magnetic solid phase extraction coupled with *in situ* derivatization for the highly sensitive determination of acidic phytohormones in rice leaves by UPLC-MS/MS. *Analyst*, **2014**, 139 (21), 5605–5613.
282. F. Tayyari, G.A.N. Gowda, H. Gu, D. Raftery <sup>15</sup>N-Cholamine – a smart isotope tag for combining NMR- and MS-based metabolite profiling. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (18), 8715–8721.
283. S. Ogawa, H. Tadokoro, M. Sato, T. Hanawa, T. Higashi (S)-1-(4-Dimethylamino-phenylcarbonyl)-3-aminopyrrolidine: a derivatization reagent for enantiomeric separation and sensitive detection of chiral carboxylic acids by LC/ESI-MS/MS. *J. Chrom.*, **2013**, 940, 7–14.
284. S.C. Turfus, J.M. Halket, M.C. Parkin, D.A. Cowan, R.A. Braithwaite, A.T. Kicman Signal enhancement of glucuronide conjugates in LC-MS/MS by derivatization with the phosphonium propylamine cation tris(trimethoxyphenyl) phosphonium propylamine for forensic purposes. *Drug Test. Anal.*, **2014**, 6 (5), 500–505.
285. W.J. Leavens, S.J. Lane, R.M. Carr, A.M. Lockie, I. Waterhouse Derivatization for liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: synthesis of tris(trimethoxyphenyl)phosphonium compounds and their derivatives of amine and carboxylic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16 (5), 433–441.
286. V. Spikmans, S.J. Lane, B. Leavens, A. Manz, N.W. Smith On-line on-chip post-column derivatisation reactions for pre-ionisation of analytes and cluster analysis in gradient  $\mu$ -liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16 (14), 1377–1388.
287. P.J. Lee, W. Chen, J.C. Gelber Qualitative and quantitative analysis of small amine molecules by MALDI-TOF mass spectrometry through charge derivatization. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (16), 4888–4893.
288. M. Shariatgorji, A. Nilsson, P. Kallback, O. Karlsson, X. Zhang, P. Svenningsson, P.E. Andren Pyrylium salts as reactive matrices for MALDI-MS imaging of biologically active primary amines. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2015**, 26 (6), 934–939.
289. K. Karu, M. Hornshaw, G. Woffendin, K. Bodin, M. Hamberg, G. Alvelius, J. Sjoval, J. Turton, Y. Wang, W. Griffiths Liquid chromatography-mass spectrometry utilizing-stage fragmentation for the identification of oxysterols. *J. Lip. Res.*, **2007**, 48 (4), 976–987.
290. D.F. Cobice, C.L. Mackay, R.J.A. Goodwin, A. McBride, P.R. Langridge-Smith, S. Webster, B.R. Walker, R. Andrew Mass spectrometry imaging for dissecting steroid intracrinology

- within target tissue. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (23), 11576–11584.
291. Y.-W. Kim, C. Sung, S. Lee, K.-J. Kim, Y.-H. Yang, B.-G. Kim, Y.K. Lee, H.W. Ryu, Y.-G. Kim MALDI-MS-based quantitative analysis for ketone containing homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal. Chem.*, **2015**, 87 (2), 858–863.
292. S.J. Barry, R.M. Carr, S.J. Lane, W.J. Leavens, C.O. Manning, S. Monté, I. Waterhouse Use of S-pentafluorophenyl tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium acetate bromide and (4-hydrazino-4-oxobutyl) [tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide for the derivatization of alcohols, aldehydes and ketones for detection by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17 (5), 484–497.
293. M. Li, S. Biswas, M.H. Nantz, R.M. Higashi, X.-A. Fu Preconcentration and analysis of trace volatile carbonyl compounds. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (3), 1288–1293.
294. K. Yoneda, Y. Hu, M. Kita, H. Kigoshi 6-Amidopyrene as a label-assisted laser desorption/ionization (LALDI) enhancing tag: development of photoaffinity pyrene derivative. *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 17853.
295. K. Yoneda, Y. Hu, R. Watanabe, M. Kita, H. Kigoshi Binding position analysis of target proteins with the use of amidopyrene probes as LA-LDI enhancing tags. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14 (36), 8564–8569.
296. R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.*, **1997**, 69 (23), 4751–4760.
297. L.M. Sanchez, P.C. Dorrestein Virulence caught green-handed. *Nat. Chem.* **2013**, 5 (3) 155–157.
298. P. Chaurand, M.E. Sanders, R.A. Jensen, R.M. Caprioli Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am. J. Pathol.*, **2004**, 165 (4), 1057–1068.
299. L.A. McDonnell, R.M.A. Heeren Imaging mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.*, **2007**, 26 (4), 606–643.
300. S.A. Schwartz, M.L. Reyzer, R.M. Caprioli Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom.*, **2003**, 38 (7), 699–708.
301. R. Kruse, J.V. Sweedler Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14 (7), 752–759.
302. M.L. Reyzer, Y. Hsieh, K. Ng, W.A. Korfmacher, R.M. Caprioli Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2003**, 38 (10), 1081–1092.
303. T.C. Rohner, D. Staab, M. Stoeckli. MALDI mass spectrometric imaging biological tissue sections. *Mech. Ageing Dev.*, **2004**, 126 (1), 177–185.
304. S.L. Luxembourg, T.H. Mize, L.A. McDonnell, R.M.A. Heeren High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface. *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (18), 5339–5344.
305. S. Maharrey, R. Bastasz, R. Behrens, A. Highley, S. Hoffer, G. Kruppa, J. Whaley High mass resolution SIMS. *Appl. Surf. Sci.*, **2004**, 231/232, 972–975.
306. I.M. Taban, A.F.M. Altelaar, J. Fuchser, Y.E.M. van der Burgt, L.A. McDonnell, G. Baykut, R.M.A. Heeren Imaging of peptides in the rat brain using MALDI-FTICR mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2007**, 18 (1), 145–151.

307. M. Svensson, K. Skold, P. Svenningsson, P.E. Andren Peptidomics-based discovery of novel neuropeptides. *J. Proteome Res.*, **2003**, 2 (2), 213–219.
308. S. Georgiou, F. Hillenkamp Introduction: laser ablation of molecular substrates. *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (2), 317–320.
309. A. Delcorte, B.J. Garrison Particle-induced desorption of kilodalton molecules embedded in a matrix: A molecular dynamics study. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107 (10), 2297–2310.
310. F.-Y. Che, J. Lim, H. Pan, R. Biswas, L.D. Fricker Quantitative neuropeptidomics of microwave-irradiated mouse brain and pituitary. *Mol. Cell Proteom.*, **2005**, 4 (9), 1391–1405.
311. A.F.M. Altelaar, J. Minnen, C.R. Jimenez, R.M.A. Heeren, S.R. Piersma Direct molecular imaging of *lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2005**, 77 (3), 735–741.
312. K.E. Schriver, P. Chaurand, R.M. Caprioli High resolution imaging mass spectrometry: Characterization of ion yields and spot sizes. 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, Canada, **2003**, 485–489.
313. R. Lemaire, J.C. Tabet, P. Ducoroy, J.B. Hendra, M. Salzet, I. Fournier Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal. Chem.*, **2006**, 78 (3), 809–819.
314. J.C. Vickerman, D. Briggs, A. Henderson The static SIMS library: surface spectra. **2006** (<http://surfacespectra.com/simslibrary/>).
315. K. Yanagisawa, Y. Shyr, B.J. Xu, P.P. Massion, P.H. Larsen, B.C. White, J.R. Roberts, M. Edgerton, A. Gonzalez, S. Nadaf, J.H. Moore, R.M. Caprioli, D.P. Carbone Proteomic patterns of tumour subsets in non-smallcell lung cancer. *Lancet*, **2003**, 362 (9382), 433–439.
316. L. Puglielli, R.E. Tanzi, D.M. Kovacs Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.*, **2003**, 6 (4), 345–351.
317. R.G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W.A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso, M.P. Mattson Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101 (7), 2070–2075.
318. D. Touboul, H. Piednoel, V. Voisin, S. De La Porte, A. Brunelle, F. Halgand, O. Laprevote Changes in phospholipid composition within the dystrophic muscle by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 10 (5), 657–664.
319. S. Chandra, D.R. Smith, G.H. Morrison Subcellular imaging by dynamic SIMS ion microscopy. *Anal. Chem.*, **2000**, 72 (3), 104A–114A.
320. P.J. Todd, T.G. Schaaff, P. Chaurand, R.M. Caprioli Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrixassisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36 (4), 355–369.
321. J. Clerc, C. Fourre, P. Fragu SIMS microscopy: methodology, problems and perspectives in mapping drugs and nuclear medicine compounds. *Cell Biol. Int.*, **1997**, 21 (10), 619–633.
322. A.M. Belu, M.C. Davies, J.M. Newton, N. Patel TOF-SIMS characterization and imaging of controlled-release drug delivery systems. *Anal. Chem.*, **2000**, 72 (22), 5625–5638.

323. J. Bunch, M.R. Clench, D.S. Richards Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18 (24), 3051–3060.
324. P. Chaurand, S. Fouchecourt, B.B. Da Gue, B.J. Xu, M.L. Reyzer, M-C. Orgebin-Crist, R.M. Caprioli Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry. *Proteomics*, **2003**, 3 (11), 2221–2239.
325. M. Stoeckli, P. Chaurand, D.E. Hallahan, R.M. Caprioli Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.*, **2001**, 7 (4), 493–496.
326. K. Dreisewerd The desorption process in MALDI. *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (2), 395–425.
327. V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. *Anal. Chem.*, **2001**, 73 (5), 1016–1022.
328. V. Horneffer, R. Reichelt, K. Strupat Protein incorporation into MALDI matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 226 (1), 117–131.
329. S.D. Hanton, P.A. Cornelio Clark, K.G. Owens Investigations of matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10 (2), 104–111.
330. S.L. Luxembourg, L.A. McDonnell, M. Duursma, X. Guo, R.M.A. Heeren Effect of local matrix crystal variations in matrix-assisted ionization techniques for mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2003**, 75 (10), 2333–2341.
331. A.C. Crecelius, D.S. Cornett, R.M. Caprioli, B. Williams, B.M. Dawant, B. Bodenheimer Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16 (7), 1093–1099.
332. M.S. Shchepinov, R. Chalk, E.M. Southern Trityl mass-tags for encoding in combinatorial oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1999**, 42, 107–108.
333. M.S. Shchepinov, R. Chalk, E.M. Southern Trityl tags for encoding in combinatorial synthesis. *Tetrahedron*, **2000**, 56 (17), 2713–2724.
334. K.R. Birikh, V.A. Korshun, P.L. Bernad, A.D. Malakhov, N. Milner, S. Khan, E.M. Southern, M.S. Shchepinov Novel mass tags for single nucleotide polymorphism detection. *Anal. Chem.*, **2008**, 80 (7), 2342–2350.
335. K.R. Birikh, P.L. Bernad, V.V. Shmanai, A.D. Malakhov, M.S. Shchepinov, V.A. Korshun SNP detection using trityl mass tags. *Meth. Mol. Biol.*, **2009**, 578, 345–361.
336. P.L. Bernad, S. Khan, V.A. Korshun, E.M. Southern, M.S. Shchepinov S(O)-Pixyl protecting group as efficient mass-tag. *Chem. Commun.*, **2005** (27), 3466–3468.
337. G. Thiery, E. Anselmi, A. Audebourg, E. Darii, M. Abarbri, B. Terris, J.-C. Tabet, I.G. Gut Improvements of Targeted multiplex mass spectrometry IMagingio *Proteomics*, **2008**, 8 (18), 3725–3734.
338. J. Yang, P. Chaurand, J.L. Norris, N.A. Porter, R.M. Caprioli Activity-based probes linked with laser-cleavable mass tags for signal amplification in imaging mass spectrometry: analysis of serine hydrolase enzymes in mammalian tissue. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (8), 3689–3695.
339. R. Lemaire, J. Stauber, M. Wisztorski, C. Van Camp, A. Desmons, M. Deschamps, G. Proess, I. Rudlof, A. S. Woods, R. Day, M. Salzet, I. Fournier Tag-Mass: specific

- molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J Proteome Res.*, **2007**, 6 (6), 2057–2067.
340. *N. Kang, J.-M. Lee, A. Jeon, H.B. Oh, B. Moon* Design and synthesis of new mass tags for matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) based on 6,11-dihydrothiochromeno[4,3-b]indole. *Tetrahedron*, **2016**, 72 (36), 5612–5619.
341. *H. Sahoo* Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback. *RCS Adv.*, **2012**, 2 (18), 7017–7029.
342. *G. Thiery, M.S. Shchepinov, E.M. Southern, A. Audebourg, V. Audard, B. Terris, I.G. Gut* Multiplex target protein imaging in tissue sections by mass spectrometry – TAMSIM. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21 (6), 823–829.
343. *C. Dai, L. H. Cazares, S. L. Wang, D. A. Troyer, O. J. Semmes, R. R. Drake, B. Wang* Using boronolactin in MALDI-MS imaging for the histological analysis of cancer tissue expressing the sialyl Lewis X antigen. *Chem. Commun.*, **2011**, 47 (37), 10338–10340.
344. *G. Thiery, R.L. Mernaugh, H. Yan, J.M. Spraggins, J. Yang, F.F. Parl, R.M. Caprioli* Targeted multiplex imaging mass spectrometry with single chain fragment variable (scfv) recombinant antibodies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, 23 (10), 1689–1696.
345. *M. Lorey, B. Adler, H. Yan, R. Soliymani, S. Ekström, J. Yli-Kauhaluoma, T. Laurell, M. Baumann* Mass-tag enhanced immune-laser desorption/ionization mass spectrometry for sensitive detection of intact protein antigens. *Anal. Chem.*, **2015**, 87 (10), 5255–5262.
346. *K.A. White, D.A. Chengelis, K.A Gogick, J. Stehman, N. L. Rosi, S. Petoud* Near-infrared luminescent lanthanide MOF barcodes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131 (50), 18069–18071.
347. *A. Gunnarsson, P. Sjövall, F. Höök* Liposome-based chemical barcodes for single molecule DNA detection using imaging mass spectrometry. *Nano Lett.*, **2010**, 10 (2), 732–737.
348. *T. Briese, G. Palacios, M. Kokoris, O. Jabado, Z. Liu, N. Renwick, V. Kapoor, I. Casas, F. Pozo, R. Limberger, P. Perez-Brena, J. Ju, W. I. Lipkin* Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, **2005**, 11 (2), 310–313.
349. *C.R. Becer, R. Hoogenboom, U.S. Schubert* Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48 (27), 4900–4908.
350. *И.А. Дьяконов, Р.Р. Костиков* Катион циклопропенилия. *Успехи химии*, **1967**, 36 (8), 1305–1319.
351. *S.L. Manatt, J.D. Roberts* Small ring compounds. XXIV. Molecular orbital calculation of the delocalization energies of some small-ring systems. *J. Org. Chem.*, **1959**, 24 (9), 1336–1338.
352. *A.W. Krebs* Cyclopropenilium compounds and cyclopropenones. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1965**, 4 (1), 10–22.
353. *A. Krebs* Structure and reactivity of cyclopropenones III Assignment of infrared and Raman bands in cyclopropenones. *Tetrahedron Lett.*, **1968** (57), 5935–5938.
354. *M.A. Battiste, B. Halton* Mass spectrometry of carbonium ion salts: 3-halogeno-1,2,3-triphenylcyclopropanes. *Chem. Commun.*, **1968** (22), 1360–1370.
355. *A.S. Monahan, J.D. Freilich, J.-J. Fong* Some reactions of 3-ethoxy-1,2,3-triphenylcyclopropene. *Tetrahedron Lett.*, **1970** (22), 1865–1866.
356. *A. Heydt, H. Heydt, B. Weber, M. Regitz* (Diazomethyl)cyclopropene durch elektrophile Diazoalkan-substitution. *Chem. Ber.*, **1982**, 115 (9), 2965–2980.

357. A.S. Monahan, J.D. Freilich, J.-J. Fong, D. Kronenthal Reactions of derivatives of 1,2,3-triphenylcyclopropene with iron salts. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43 (2), 232–238.
358. R. Weiss, H. Kölbl, C. Schlierf Controlled substituent exchange in cyclopropenium ion. Role of counterion in Friedel-Crafts reactions of the trichlorocyclopropenium ion. *J. Org. Chem.*, **1976**, 41 (13), 2258–2262.
359. E.B. Troughton, K.E. Molter, E.M. Arnett Coordination, heterolysis, and electron-transfer reactions involving delocalized carbocations and carbanions in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106 (22), 6726–6735.
360. H. Li, K. Ren, D.C. Neckers Photochemical reactions of substituted cyclopropenium salts. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66 (25), 8556–8562.
361. K. Komatsu, T. Kitagawa Cyclopropenilium cations, cyclopropenones, and heteroanalogues – recent advances. *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (4), 1371–1427.
362. R. Breslow, C. Yuan The *sym*-triphenylcyclopropenyl cation, a novel aromatic system. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80 (22), 5991–5994.
363. R. Breslow, H.W. Chang Triarylcyclopropenium ions. Synthesis, and stability in the phenyl *p*-anysyl series. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83 (10), 2367–2375.
364. S. Tobey, R. West Pentachlorocyclopropane. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88 (11), 2478–2481.
365. J.-R. Syu, C.-H. Lin, C.-W. Kuo, D.-Y. Yang Synthesis of benzofuran-containing spiro lactones from diarylcyclopropenones. *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 55 (6), 1207–1211.
366. E. Klimova, T. Klimova, I. Lijanová, C.J. Dominguez, O.S. Hernandez, I.D. Mendez, G.M. Matinez Symmetrical and asymmetrical cyclopropenones: synthesis, and study of their chemical reactivity. *Open Org. Chem. J.*, **2008**, 2, 35–40.
367. D.H. Wadsworth, B.A. Donatelli Preparation of diarylacetylenes via cyclopropenones. *Synthesis*, **1981** (4), 285–286.
368. K. Komatsu, I. Tomioka, K. Okamoto Synthesis and properties of bis(cyclopropylphenyl)cyclopropenones and the tris(*p*-cyclopropylphenyl)cyclopropenium ion. *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **1979**, 52 (3), 856–860.
369. R. Xu, R. Breslow 1,2,3-Triphenylcyclopropenium bromide *Org. Synth.*, **1997**, 74, 72.
370. R. Breslow Quantitative studies on aromaticity and antiaromaticity *Pure Appl. Chem.*, **1971**, 28 (3), 111–130.
371. S. Yoneda, H. Hirai, Z. Yoshida A novel synthesis of pyrroles by the reaction of tris(alkylthio)cyclopropenium salt with amines. *Heterocycles*, **1981**, 15 (2), 865–869.
372. Z. Yoshida, H. Hirai, S. Miki, S. Yoneda Trithiocyclopropenium ion as a building block for nitrogen heterocycles synthesis. *Tetrahedron*, **1989**, 45 (10), 3217–3231.
373. H. Kojima, Y. Kinoshita, N. Matsumura, H. Inoue Reaction of tris(alkylthio)cyclopropenyl cations with 2-pyridylmagnesium bromide as a new route to indolizines. *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28 (8), 2059–2060.
374. H. Kojima, N. Matsumura, H. Inoue Preparation of nitrogen heterocycles from aromatic amines using tris(isopropylthio)cyclopropenyl cation as a three-carbon building block. *Can. J. Chem.*, **1992**, 70 (1), 1–4.
375. H. Kojima, K. Yamamoto, Y. Kinoshita, H. Inoue Synthesis of indolizines and pyrrolo[2,1-*b*]azoles from 2-pyridylmagnesium bromide and 2-lithiated azoles using tris(alkylthio)-cyclopropenyl cations as a three-carbon building block. *J. Heterocyclic Chem.*, **1992**, 29 (6), 1473–1476.

376. Z. Yoshida, F. Utsumi, H. Suzuki, S. Ito, S. Sakashita, T. Ogata, K. Matsumoto The reactions of monoalkylthio- and monoarylthio-substituted cyclopropenium salts with nitrogen nucleophiles: formation of polyfunctionally substituted pyrroles or pyrazoles. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1992**, 65 (3), 698–702.
377. H. Kojima, K. Yamamoto, Y. Kinoshita, H. Inoue A new route to pyridine derivatives by the reaction of tris(isopropylthio)cyclopropenilium perchlorate with  $\alpha$ -lithiated isocyanides. *J. Heterocyclic Chem.*, **1993**, 30 (6), 1691–1692.
378. H. Kojima, K. Yamamoto, K. Nakamura, H. Inoue A new synthesis of pyrrole derivatives from tris(isopropylthio)cyclopropenilium perchlorate and thioureas. *J. Heterocyclic Chem.*, **1996**, 33 (4), 1417–1418.
379. K. Komatsu, T. Kitagawa Cyclopropenilium cations, cyclopropenones, and heteroanalogues – recent advances. *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (4) 1371–1428.
380. M. Ábalos, J. M. Bayona, F. Ventura Development of a solid-phase microextraction GC-NDP procedure for the determination of free volatile amines in wastewater and sewage-polluted waters. *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (16), 3531–3537.
381. T. Gao, E. S. Tillman, N. Lewis Detection and classification of volatile organic amines and carboxylic acids using arrays of carbon black-dendrimer composite vapor detectors. *Chem. Mater.*, **2005**, 17 (11), 2904–2919.
382. S.C. Cunha, M.A. Faria, J.O. Fernandes Gas chromatography-mass spectrometry assessment of amines in Port wine and grape juice after fast chloroformate extraction/derivatization. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59 (16), 8742–8753.
383. T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta Binary fluoros alkylation of biogenic primary amines with perfluorinated aldehyde followed by fluoros liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (19), 8407–8414.
384. Z. Tang, J. Yang, J. Yu, B. Cui A colorimetric sensor for qualitative discrimination and quantitative detection of volatile amines. *Sensors*, **2010**, 10 (7), 6463–6476.
385. M.L. Cable, A.M. Stockton, M.F. Mora, P.A. Willis Low-temperature microchip nonaqueous capillary electrophoresis of aliphatic primary amines: applications to titan chemistry. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (2) 1124–1131.
386. T. Soga, Y. Jimbo, K. Suzuki, D. Citterio Inkjet-printed paper-based colorimetric sensor array for the discrimination of volatile primary amines. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (19), 8973–8978.
387. H. Awad, M.M. Khamis, A. El-Aneed Mass Spectrometry, review of basics: ionization. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2015**, 50 (2), 158–175.
388. B.W. Laursen, F.C. Krebs Synthesis of a triazatriangulenium Salt. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39 (19), 3432–3434.
389. B.W. Laursen, F.C. Krebs Synthesis, structure, and properties of azatriangulenium salts. *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7 (8), 1773–1783.
390. O.A. Реутов, А.Л. Курц, К.П. Бутин Органическая химия. М.: Изд-во МГУ. **1999**, Т. 2.
391. D. Dolman, R. Steward Strongly basic systems. VIII. The H<sub>0</sub> function for dimethyl sulfoxide–water–tetramethylammonium hydroxide. *Can. J. Chem.*, **1967**, 45 (9), 911–924.
392. N.C. Deno, J.J. Jaruzelski, A. Schriesheim Carbonium ion. An acidity function (C<sub>0</sub>) derived from arylcarbonium ion equilibria. *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77 (11), 3044–3051.

393. Ю.А. Овчинников Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
394. W.E. Siegenthaler, A. Bonetti, R. Luthy Aminoglycoside antibiotics in infectious diseases: An overview. *Am. J. Med.*, **1986**, 80 (6B), 2–14.
395. J. Jackson, C. Chen, K. Buising Aminoglycosides: how should we use them in 21 century? *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **2013**, 26 (6), 516–525.
396. B. Becker, M.A. Cooper Aminoglycoside antibiotics in the 21<sup>st</sup> century. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8 (1), 105–115.
397. Y. Tian, G. Chen, L. Guo, X. Guo, X. Mei Methodology studies on detection of aminoglycoside residues. *Food Anal. Meth.*, **2015**, 8 (7), 1842–1857.
398. F. Farouk, H. Azzazy, W.M.A. Niessen Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. *Anal. Chim. Acta.*, **2015**, 890, 21–43.
399. C. Diez, D. Guillarme, A.S. Sporri, E. Cognard, D. Ortelli, P. Edder, S. Rudaz Aminoglycoside analysis in food of animal origin with a zwitterionic stationary phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, **2015**, 882, 127–139.
400. R. Li, Y. Liu, L. Cheng, C. Yang, J. Zhang Photoelectrochemical aptasensing of kanamycin using visible light-activated carbon nitride and graphene oxidenanocomposites. *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (19), 9372–9375.
401. A. Zengin, U. Tamer, T. Caykara Extremely sensitive sandwich assay of kanamycin using surface-enhanced Raman scattering of 2-mercaptobenzothiazole labeled gold@silver nanoparticles. *Anal. Chim. Acta.*, **2014**, 817, 33–41.
402. В.Ю. Котова, К.В. Рыженкова, И.В. Манухов, Г.Б. Завильгельский Индуцируемые специфические lux-биосенсоры для детекции антибиотиков: конструирование и основные характеристики. *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **2014**, 50 (1), 112–117.
403. J.A. Dijkstra, M.G.G. Sturkenboom, K. van Hateren, R.A. Koster, B. Greijdanus, J.-W.C. Alffenaar Quantification of amikacin and kanamycin in serum using a simple and validated LC–MS/MS method. *Bioanalysis*, **2014**, 6 (16), 2125–2133.
404. D. Li, S. He, Y. Deng, G. Ding, H. Ni, Y. Cao Development and validation of an HPLC method for determination of amikacin in water samples by solid phase extraction and pre-column derivatization. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2014**, 93 (1), 47–52.
405. T.K. Sharma, R. Ramanathan, P. Weerathunge, M. Mohamadtaheri, H.K. Daima, R. Shukla, V. Bansal Aptamer-mediated ‘turn-off/turn-on’ nanozyme activity of gold nanoparticles for kanamycin detection. *Chem. Commun.*, **2014**, 50 (100), 15856–15859.
406. Y. Bijleveld, T. de Haan, J. Toersche, S. Jorjani, J. van der Lee, F. Groenendaal, P. Dijk, A. van Heijst, A.W.D. Gavilanes, R. de Jonge, K.P. Dijkman, H. van Straaten, M. Rijken, I. Zonnenberg, F. Cools, D. Nuytemans, R. Mathôt A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study. *J. Chromatogr. B.*, **2014**, 951/952, 110–118.
407. M.A.-T. Korany, R.S. Haggag, M.A. Ragab, O.A. Elmallah Liquid chromatographic determination of amikacin sulphate after pre-column derivatization. *J. Chrom. Sci.*, **2014**, 52 (8), 837–847.
408. О.В. Воронезцева, Т.Н. Ермолаева Определение аминогликозидных антибиотиков в пищевых продуктах с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров. *Сорбц. Хром. Проц.*, **2011**. 11 (1), 68–76.

409. Г.Я. Левин, Л.Н. Соснина Спектрофотометрический метод определения концентрации аминогликозидов в плазме крови. *Антибиот. Химиотер.*, **2014**, 59 (3/4), 10–11.
410. J. Chen, Z. Li, J. Ge, R. Yang, L. Zhang, L. Qu, H. Wang, L. Zhang An aptamer-based signal-on bio-assay for sensitive and selective detection of kanamycin A by using gold nanoparticles. *Talanta*, **2015**, 139, 226–232.
411. Y. Wang, S. Ji, F. Zhang, F. Zhang, B. Yang, X. Liang A polyvinyl alcohol-functionalized sorbent for extraction and determination of aminoglycoside antibiotics in honey. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1403, 32–36.
412. P.C. Jocelyn. *Biochemistry of the SH Group*. Academic Press, New York, **1972**.
413. *Biothiols*. Ed. By L. Packer, *Meth. Enzymol.* **1995**.
414. C.E. Hand, J.F. Honek Biological chemistry of naturally occurring thiols of microbial and marine origin. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68 (2), 293–308.
415. Y. Li, Y. Duan, J. Li, J. Zheng, H. Yu, R. Yang. Simultaneous nucleophilic-substituted and electrostatic interactions for thermal switching of spiropyran: a new approach for rapid and selective colorimetric detection of thiol-containing amino acids. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (11), 4732–4738.
416. X.-F. Guo, H. Wang, Y.-H. Guo, H.-S. Zhang Selective spectrofluorimetric determination of glutathione in clinical and biological samples using 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(2-maleimide)-difluoroboradiaza-s-indacene. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 633 (1), 71–75.
417. Y. Li, Y. Yang, X. Guan Benzofurazan sulfides for thiol imaging and quantification in live cells through fluorescence microscopy. *Anal. Chem.*, **2012**, 84 (15), 6877–6883.
418. S.H. Kang, W. Wei, E.S. Yeung On-column derivatization for the analysis of homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 744 (1), 149–156.
419. E. Bald, G. Chwatko, R. Glowacki, K. Kuśmierk Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1032 (1/2), 109–115.
420. X.-F. Guo, H. Wang, Y.-H. Guo, Z.-X. Zhang, H.-S. Zhang Simultaneous analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a new probe, 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(4-iodoacetamido)difluoroboradiaza-s-indacene. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216 (18), 3874–3880.
421. A. Koshiyama, K. Imai Synthesis and evaluation of a fluorogenic reagent for proteomic studies: 7-fluoro-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (DAABD-F). *Analyst*, **2010**, 135 (8), 2119–2124.
422. K.-J. Huang, C.-H. Han, C.-Q. Han, J. Li, Z.-W. Wu, Y.-M. Liu Determination of thiol compounds by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Microchim. Acta*, **2011**, 174 (3), 421–427.
423. X.-F. Guo, H. Zhu, H. Wang, H.-S. Zhang Determination of thiol compounds by HPLC and fluorescence detection with 1,3,5,7-tetramethyl-8-bromomethyldifluoroboradiaza-s-indacene. *J. Sep. Sci.*, **2013**, 36 (4), 658–664.
424. P. Capitan, T. Malmezat, D. Breuillé, C. Obled Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of stable isotopes of cysteine and glutathione in biological samples. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 732 (1), 127–135.

425. Z. Wang, Y. Zhang, H. Zhang, P. B. Harrington, H. Chen Fast and selective modification of thiol proteins/peptides by *N*-(phenylseleno) phthalimide. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2011**, 23 (3), 520–529.
426. S. Vichi, N. Cortés-Francisco, J. Caixach Determination of volatile thiols in lipid matrix by simultaneous derivatization/extraction and liquid chromatography–high resolution mass spectrometric analysis. Application to virgin olive oil. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1318, 180–188.
427. S. Vichi, Y. Jerí, N. Cortés-Francisco, J. Caixach Determination of volatile thiols in roasted coffee by derivatization and liquid chromatography–high resolution mass spectrometric analysis. *Food Res. Int.*, **2014**, 64, 610–617.
428. S. Vichi, N. Cortés-Francisco, J. Caixach Analysis of volatile thiols in alcoholic beverages by simultaneous derivatization/extraction and liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Food Chem.*, **2015**, 175, 401–408.
429. V. Liem-Nguyen, S. Bouchet, E. Björn Determination of sub-nanomolar levels of low molecular mass thiols in natural waters by liquid chromatography tandem mass spectrometry after derivatization with *p*-(hydroxymercuri) benzoate and online preconcentration. *Anal. Chem.*, **2015**, 87 (2), 1089–1096.
430. N. Ochiai, K. Sasamoto, T. Kishimoto Development of a method for the quantitation of three thiols in beer, hop, and wort samples by stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63 (30), 6698–6706.
431. Y. Sun, T. Yao, X. Guo, Y. Peng, J. Zheng Simultaneous assessment of endogenous thiol compounds by LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1029/1030, 213–221.
432. M. Wang, S. Zhao, X. Liu, Q. Shi Molecular characterization of thiols in fossil fuels by Michael addition reaction derivatization and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2016**, 88 (19), 9837–9842.
433. J. Li, X. Ma, X. Wang, S. Xiong, S. Dong, S. Wang Enhanced detection of thiol peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry after selective derivatization with a tailor-made quaternary ammonium tag containing maleimidyl group. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21 (16), 2608–2612.
434. L. Vasicek, J.S. Brodbelt Enhanced electron transfer dissociation through fixed charge derivatization of cysteines. *Anal. Chem.*, **2009**, 81 (19), 7876–7884.
435. Y.-Q. Huang, G.-D. Ruan, J.-Q. Gao, Y.-Q. Feng Use of isotope differential derivatization for simultaneous determination of thiols and oxidized thiols by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **2011**, 416 (2), 159–166.
436. P. Liu, Y.-Q. Huang, W.-J. Cai, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng Profiling of thiol-containing compounds by stable isotope labeling double precursor ion scan mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (19), 9765–9773.
437. X. Qiao, R. Wang, G. Li, H. Yan, Y. Zhou, L. Zhang, Y. Zhang Imidazolium-based iodoacetamide functional tags: design, synthesis, and property study for cysteinylpeptide analysis by mass spectrometry. *Analyst*, **2014**, 139 (4), 705–708.
438. D.L. Capone, R. Ristic, K. H. Pardon, D. W. Jeffery Simple quantitative determination of potent thiols at ultratrace levels in wine by derivatization and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) analysis. *Anal. Chem.*, **2015**, 87 (2), 1226–1231.

439. W. Nadler, R. Berg, P. Walch, S. Hanke, M. Baalman, A. Kerner, A. Trumpp, C. Roesli Ion source-dependent performance of 4-vinylpyridine, iodoacetamide, and *N*-maleoyl derivatives for the detection of cysteine-containing peptides in complex proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 408 (8), 2055–2067.
440. P. Liu, C.-B. Qi, Q.-F. Zhu, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng Determination of thiol metabolites in human urine by stable isotope labeling in combination with pseudo-targeted mass spectrometry analysis. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 21433.
441. B.K. Rubin Mucolytics, expectorants, and mucokinetic medications. *Resp. Care*, **2007**, 52 (7), 859–865.
442. R.C. Heel, R. N. Brogden, T. M. Speight, G. S. Avery Captopril: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, **1980**, 20 (6), 409–452.
443. H.V. Aposhian, M. M. Aposhian Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1990**, 30, 279–306.
444. F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C.V.B. Christensen Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32 (1), e9.
445. К. Вейгард, Г. Хигельтаг, Методы эксперимента в органической химии. М., «Издательство Химия». **1968**.
446. N. Zhou, L. Wang, D.W. Thompson, Y. Zhao OPE/OPV H-mers: synthesis, electronic properties, and spectroscopic responses to binding with transition metal ions. *Tetrahedron*, **2011**, 64 (1), 125–143.
447. T.A. Cross, M.C. Davis Synthesis of hydroxyalkyl-substituted, push-pull chromophores based on diphenylacetylenes and 1,4-bis(phenylethynyl)benzenes. *Synth. Comm.*, **2008**, 38 (4), 499–516.
448. C. Xu, M. Xu, Y. Jia, C. Li Gold-catalyzed synthesis of benzil derivatives and  $\alpha$ -keto imides via oxidation of alkynes. *Org. Lett.*, **2011**, 13 (6), 1556–1559.
449. B.B. Wang, Y.M. Ye, J.J. Chen, X.X. Zhou, J.M. Lu, L.-X. Shao 2,2'-Diamino-6,6'-dimethylbiphenyl as an efficient ligand in the CuI-catalyzed Sonogashira reaction of aryl iodides and bromides with terminal alkynes. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **2011**, 84 (5), 526–530.
450. Ch. Lin, Y. Wang, Ch. Lee Efficient copper-catalyzed cross-coupling reaction of alkynes with aryl iodides. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010** (23), 4368–4371.
451. А.Д. Малахов, Е.В. Малахова, С.В. Кузнецова, И.В. Гречишников, И.А. Прохоренко, М.В. Скоробогатый, В.А. Коршун, Ю.А. Берлин Синтез и флуоресцентные свойства 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридинсодержащих олигодезоксирибонуклеотидов. *Биорг. химия*, **2000**, 26 (1), 39–50.
452. H. Suzuki Direct iodination of polialkylbenzenes *Org. Synth.*, **1971**, 51, 94.
453. H. Neunhoeffer, H. Vötter, H. Ohl 1.2.3-Triazine. I. *Chem. Ber.*, **1972**, 105 (11) 3695–3703.
454. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A. et al. // Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
455. <http://www.chemcraftprog.com/>
456. H. Yoshida, M. Nakajima, T. Ogata, K. Matsumoto, R. Morrin Acheson, J.D. Wallis A novel cyclization reaction of alkylthiodiphenylcyclopropenium ions with acyclic 1,3-diketones to

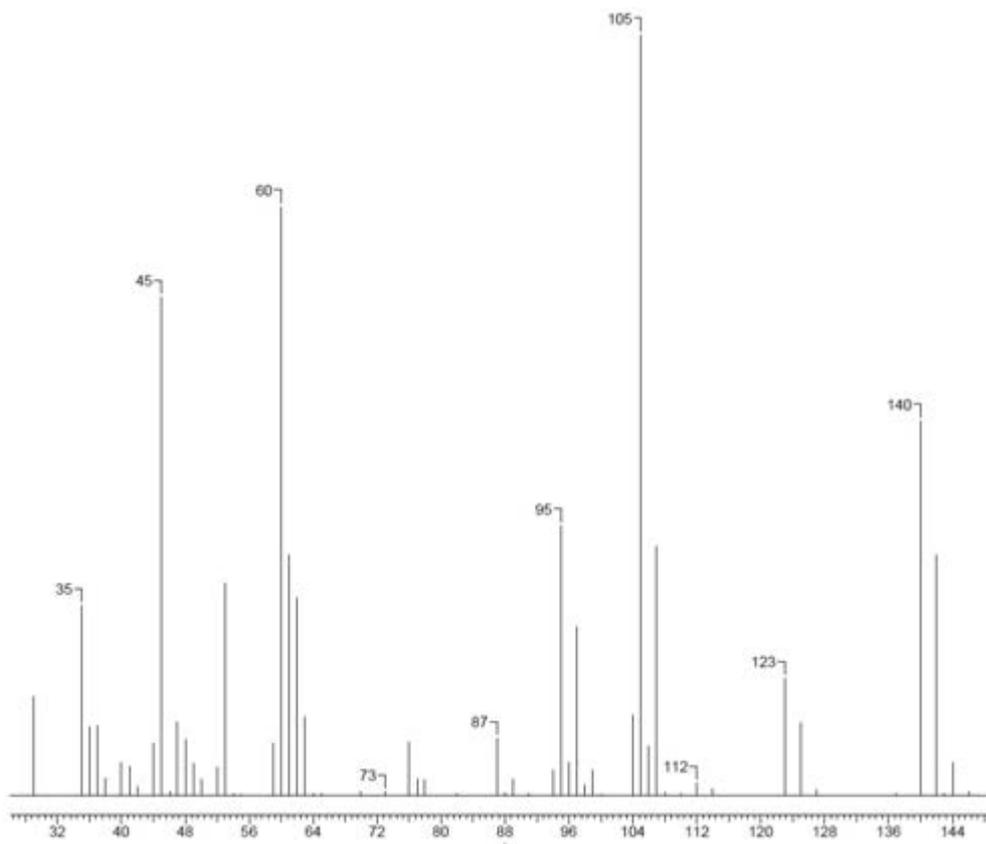
- give cyclopentadienols. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1983**, 56 (10), 3015–3019.
457. В.И. Минкин, И.Е. Михайлов, Г.А. Душенко, О.Е. Компан, А. Жунке Быстрые и обратимые миграции N,S-центрированных по периметрам циклопропенового и циклогептатриенового колец. *Изв. Акад. Наук. Сер. Химич.*, **1998**, 47 (5), 913–923.
458. J.C. Martin, R.G. Smith Factors influencing the basicities of triarylcarbinols. The synthesis of sesquixanthidrol. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86 (11), 2252–2256.
459. E.D. Nasca, T.H. Lambert Higher-order cyclopropenimine superbases: direct neutral bronsted base catalyzed Michael reactions with  $\alpha$ -aryl esters. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137 (32), 10246–10253.
460. N. Zhou, Q. Wang, A.J. Lough, H. Yan Preparation of (Z)-1,2-dicholoalkenes from terminal alkynes. *Can. J. Chem.*, **2012**, 90 (7), 625–630.
461. X. Feng, J.J. Wang, Z. Xun, Z. Huag, D.Q. Shi Multicomponent strategy to indeno[2,1-c]pyridine and hydroisoquinoline derivatives through cleavage of carbon-carbon bond. *J. Org. Chem.*, **2015**, 80 (2), 1025–1033.
462. T. Jaime, Q. Leticia, S. Fernando Regioselective alkylation of 3,4-dihydro-2H-pyran by xanthate-mediated free radical non-chain process. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46 (5), 7691–7694.
463. Y. Chelovot, J. Martins, N. Milosevic, D. Leonard, S. Zeng, M. Malissard, E.G. Berger, P. Marier, H.J. Mathieu, D.H.G. Crout, H. Sigrist Immobilisation on polysterene of diazirine derivatives of mono- and disaccharides: biological activities of modified surfaces. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9 (11), 2943–2953.
464. X. Li, F. Yang, Y. Wu Palladacycle-catalyzed decarboxylative coupling of alkynyl carboxylic acids with aryl chlorides under air. *J. Org. Chem.*, **2013**, 78 (9), 4543–4550.
465. X. Zhang, P. Li, Y. Ji, L. Zhang, L. Wang An efficient and recyclable magnetic-nanoparticle-supported palladium catalyst for the Suzuki coupling reactions of organoboronic acids with alkynyl bromides. *Synthesis*, **2011** (18), 2975–2983.
466. B. Kelly, T. Lambert Cyclopropenium-activated cyclodehydration of diols. *Org. Lett.*, **2011**, 13 (4), 740–743.
467. G. Kuzmonich, M.N. Gard, M.A. Garcia-Garibay Photonic amplification by a singlet-state quantum chain reaction in the photodecarboxylation of crystalline diarylcyclopropenones. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131 (32), 11606–11614.
468. B. Föhlisch, P. Bürgle Cyclopropenyliumsalze und chinocyclopropene *Liebigs Ann. Chem.*, **1967**, 701, 67–87.
469. A. Keasey, P.M. Maitlis The preparation, structures, and reactions of the metallacyclobutenyl complexes  $[M_3\{C_3R^1R^2\}_2X_2]$  derived from addition of triarylcylopropenium salts to zerovalent palladium and platinum compounds. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1978**, 1830–1839.
470. H. Yoshida, H. Sano, T. Ogata, K. Matsumoto Regioselective ring opening reactions of 1-aminocyclopropenes via carbenium ion and carbene intermediates. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1988**, 61 (12), 4341–4346.
471. В.Н. Плоткин, И.Н. Дюмин, Е.Ф. Дмитриева, М.И. Комендантов Синтез и термодинамическая изомеризация 1,2,3-трифенил-3-(диацилметил)-циклопропенов. *Жур. Орг. Хим.*, **1987**, 23 (5), 1115–1118.
472. M.S. Shchepinov Derivatized molecules for mass spectrometry. **2005**, EP1506959 A2
473. S.W. Tobey, R. West Pentachlorocyclopropane. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88 (11), 2478–

2481.

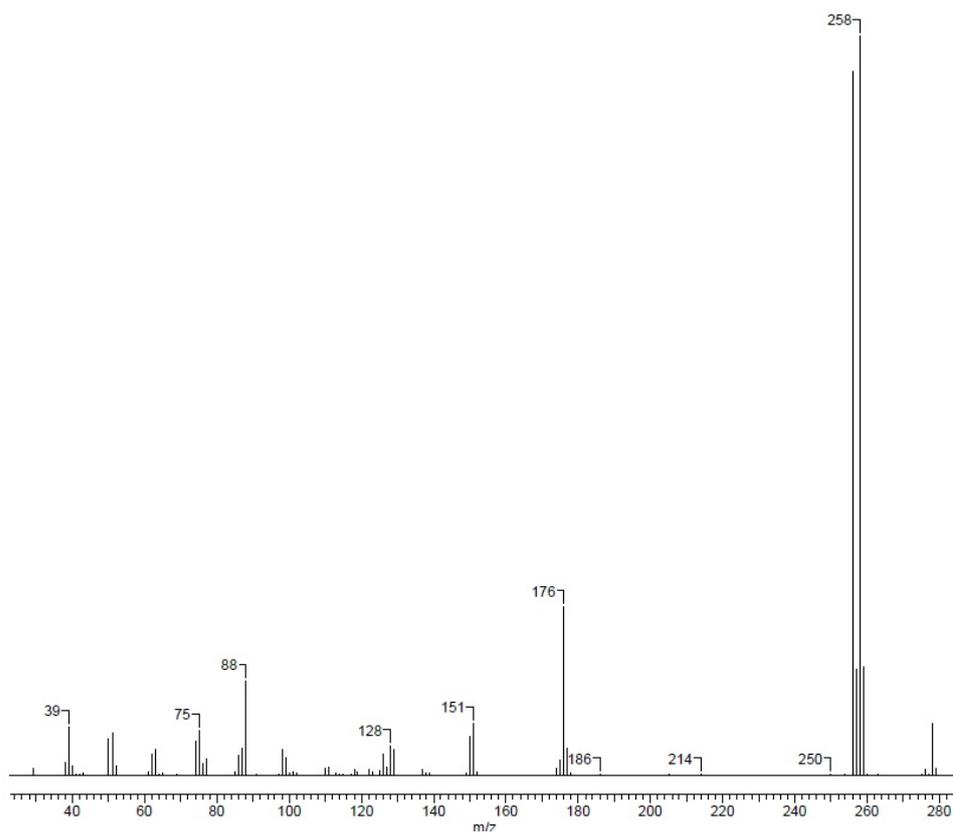
474. A.Roedig, G. Märkl Zur Konstitution der verschiedenen Verbindungen C<sub>5</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Über die Perchlorderivate von Cyclopenten-(1)-dion-(3.5), Pyron-(2) und Protoanemonin. *Liebigs Ann. Chem.*, **1960**, 636, 1–18.
475. E. McNeil, T.E. Barder, S.L. Buchwald Palladium-catalyzed silylation of aryl chlorides with hexamethyldisilane. *Org. Lett.*, **2007**, 9 (19), 3785–3788.
476. E.B. Merkushev, N.D. Simakhina, G.M. Koveshnikova A new, convenient iodination method of aromatic compounds. *Synthesis*, **1980** (6), 486–487.
477. Sh. Kajigaeshi, T. Kakinami, M. Moriwaki, T. Tanaka, Sh. Fujisaki, T. Okamoto Halogenation using quaternary ammonium polyhalides. XIV. Aromatic bromination and iodination of arenes by use of benzyltrimethylammonium polyhalides–zinc chloride system. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1989**, 62 (2), 439–443.
478. M.F. Carroll, A.R. Bader The reactions of diketene with ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75 (21), 5400–5402.
479. G. Zhang Easy copper-, ligand-, and amine-free Sonogashira coupling reaction catalyzed by palladium on carbon at low catalyst loading and by exposure by air. *Synlett*, **2005** (4), 619–622.
480. T. Shioiri, Y. Iwamoto, T. Aoyama New methods and reagents in organic synthesis. 68. Reaction of thioketones with lithium trimethylsilyldiazomethane. *Heterocycles*, **1987**, 26 (6), 1467–1470.
481. X. Shen, D.M. Ho, R.A. Pascal Synthesis of polyphenylene dendrimers related to “cubic graphene”. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126 (18), 5798–5805.
482. D.H. Wadsworth, B.A. Donatelli Preparation of diarylacetylenes via cyclopropenones. *Synthesis*, **1981** (4), 285–286.
483. Ю. Чэн-е, М.Н. Щукина Меркаптоаналоги лизина и некоторые их производные. 1. Синтез ε-меркапто-α-аминокапроновой кислоты и ее S-алкин и N-сульфанилзамещенных. *Ж. Общ. Хим.*, **1957**, 27 (5), 824–831.

## Приложения

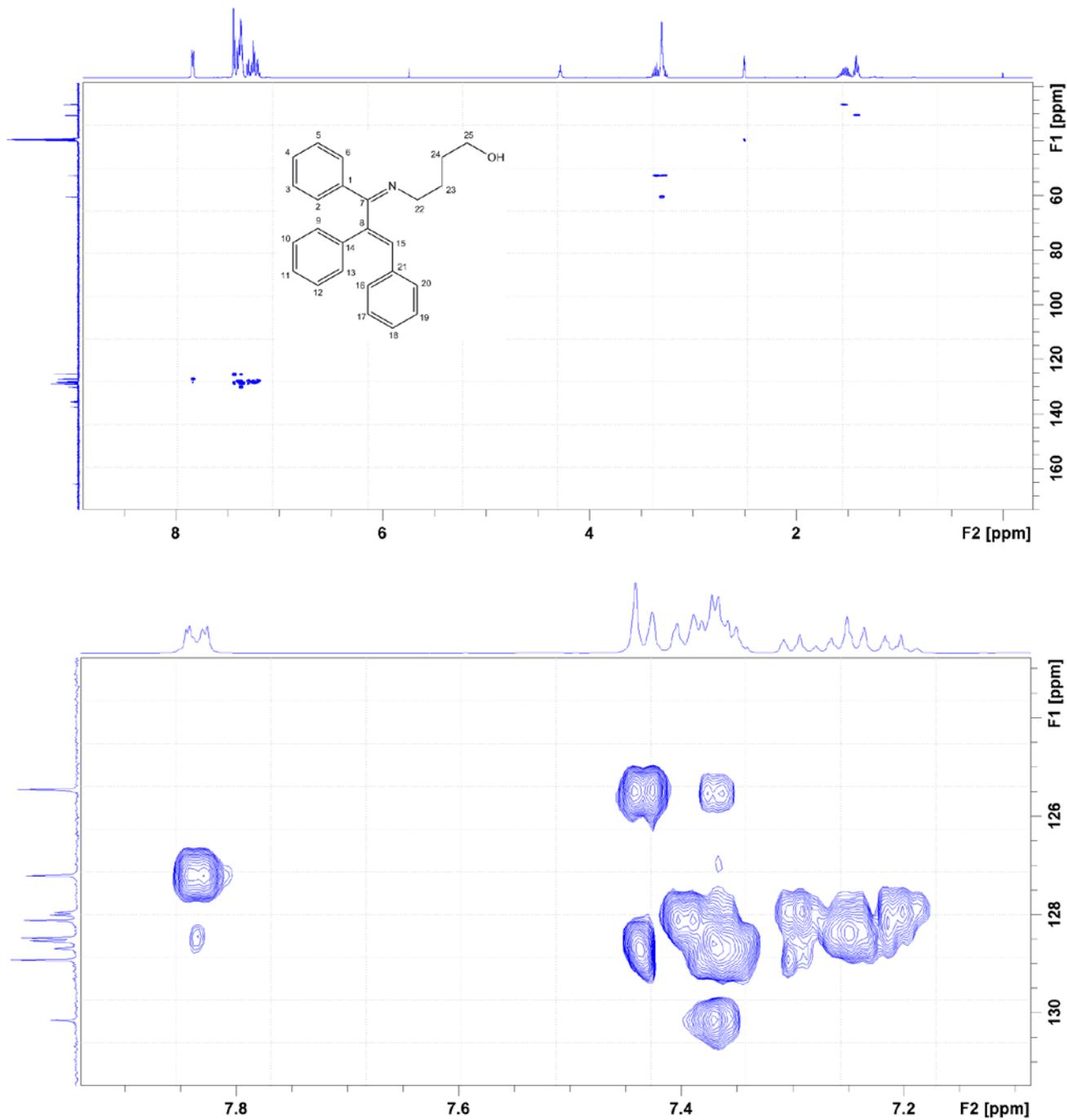
Масс-спектр соединения (2.21)



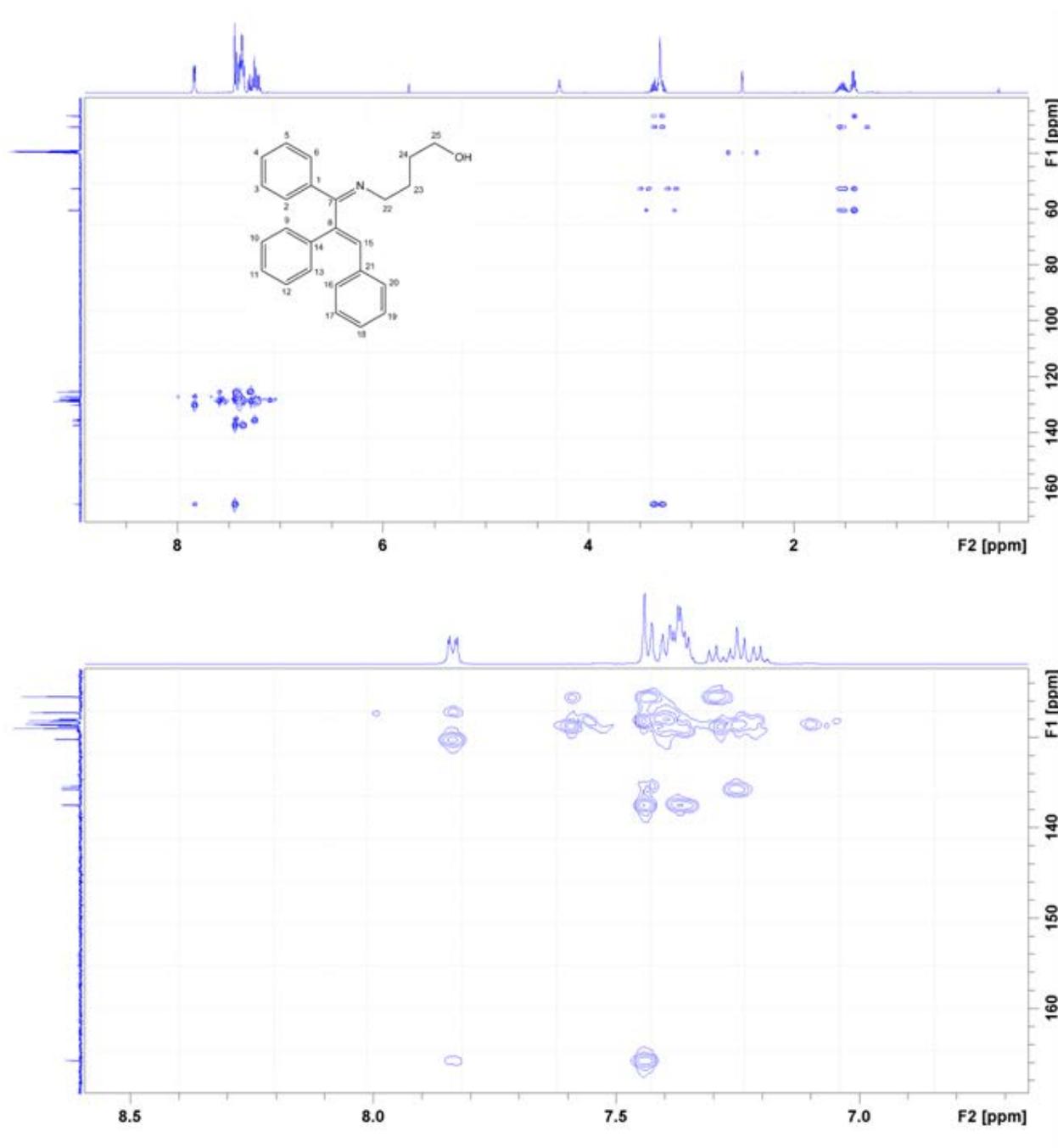
Масс-спектр соединения (2.26)



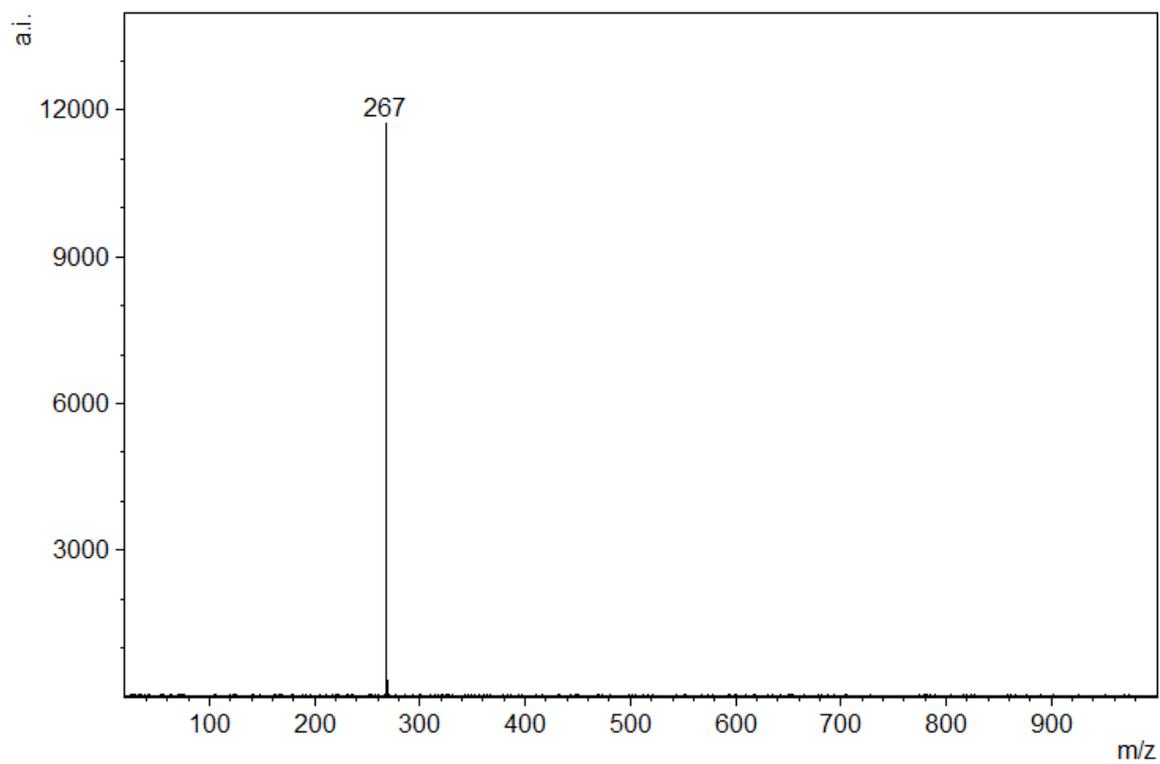
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC ЯМР (2.49d) (DMSO- $d_6$ ):



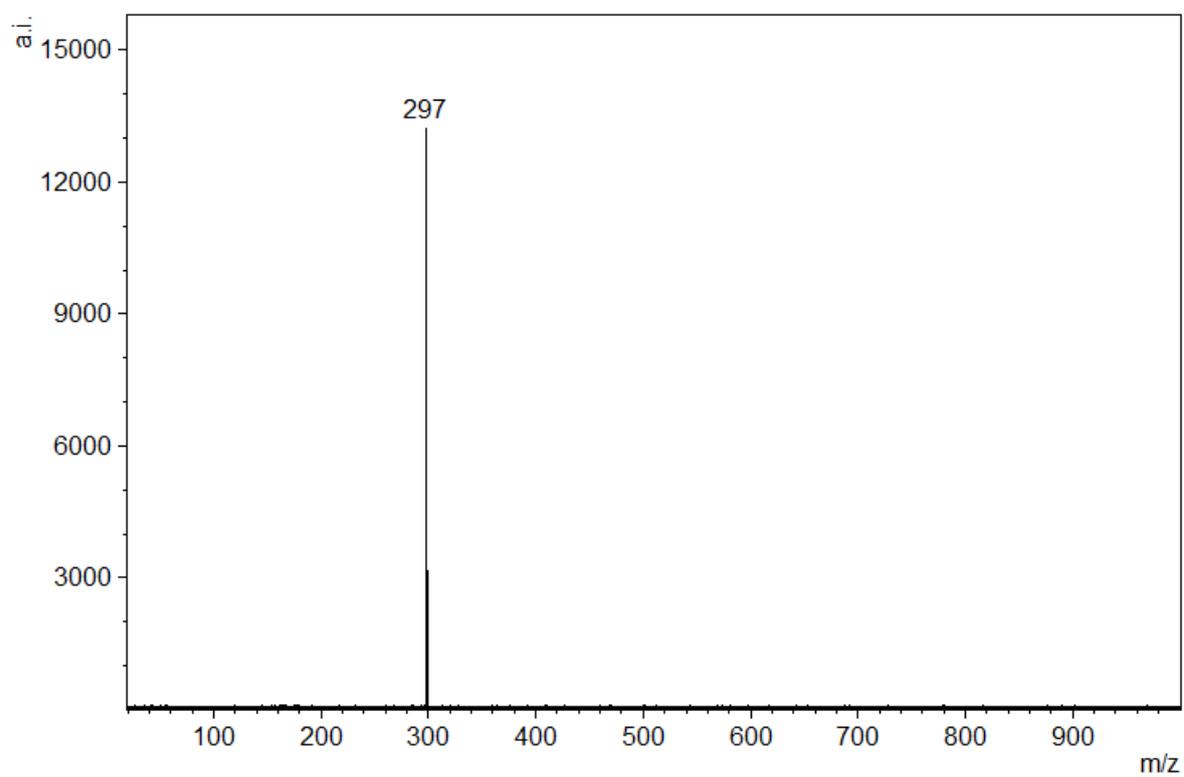
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC ЯМР (2.49d) ( $\text{DMSO-}d_6$ ):



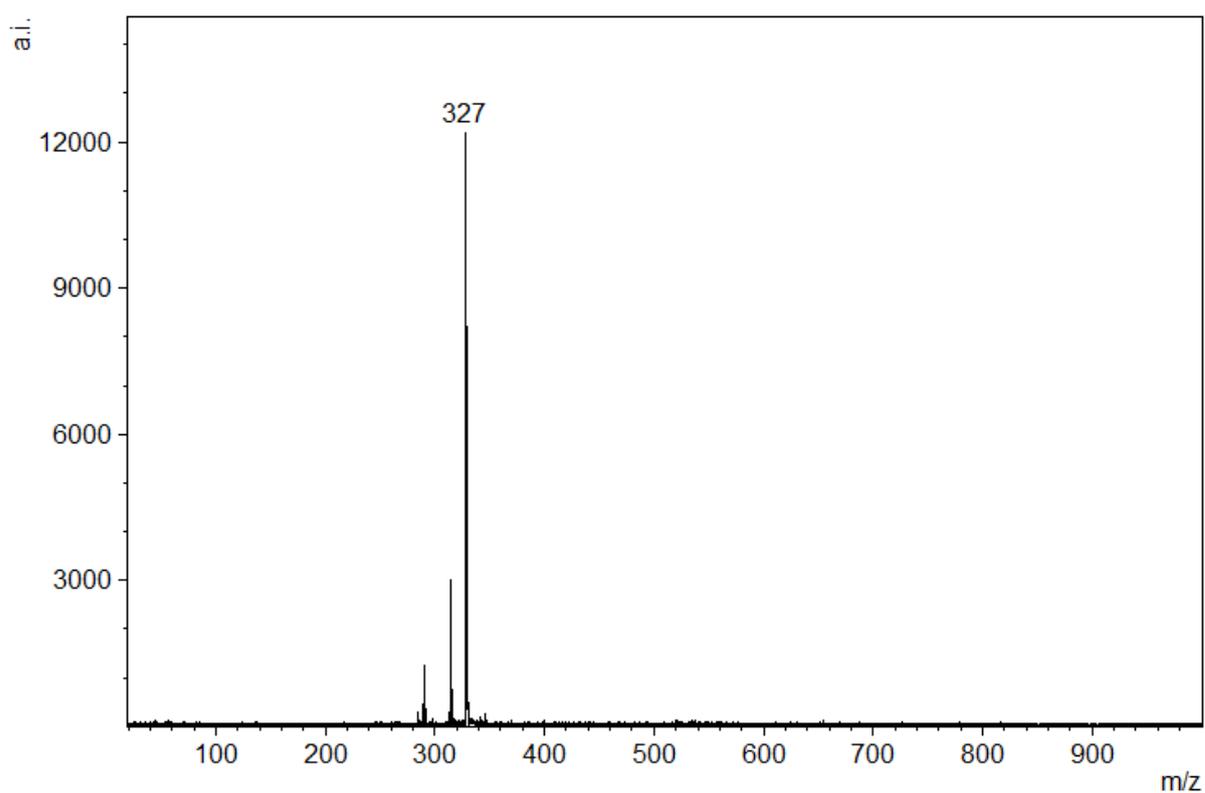
Масс-спектр соединения (2.33)



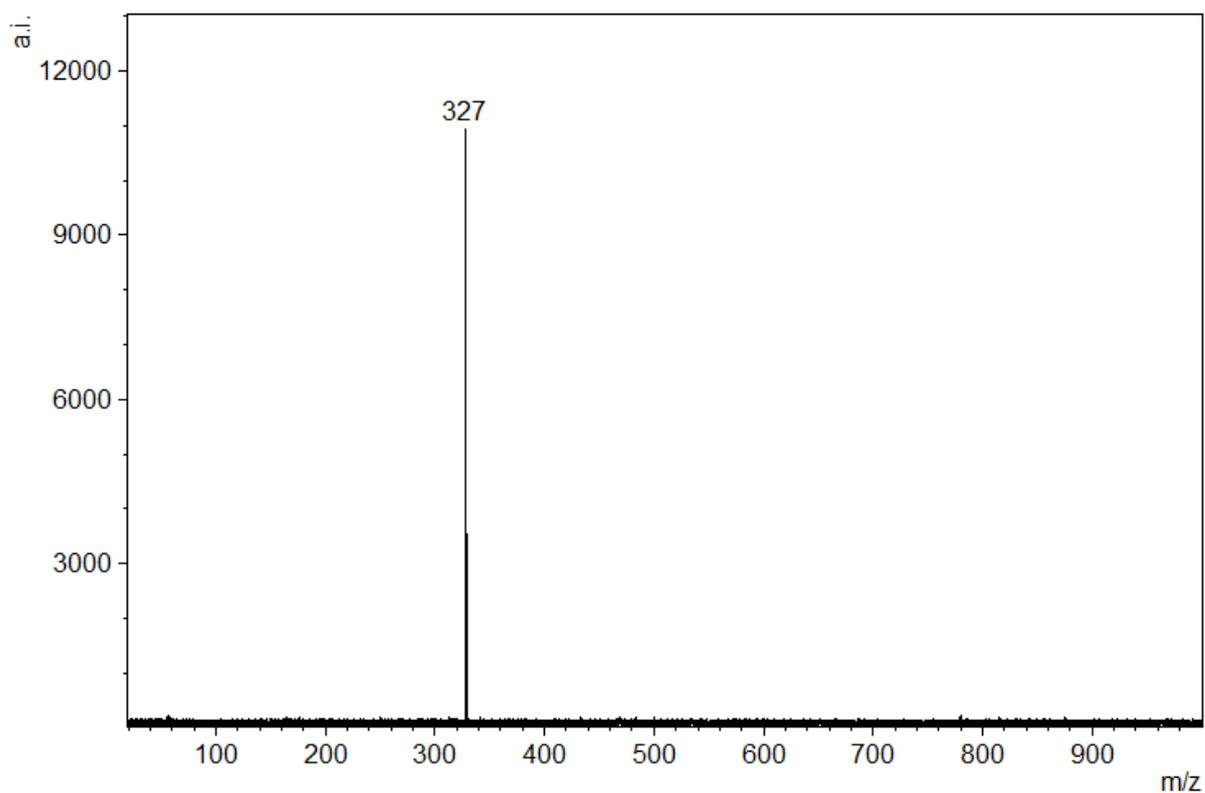
Масс-спектр соединения (2.35)



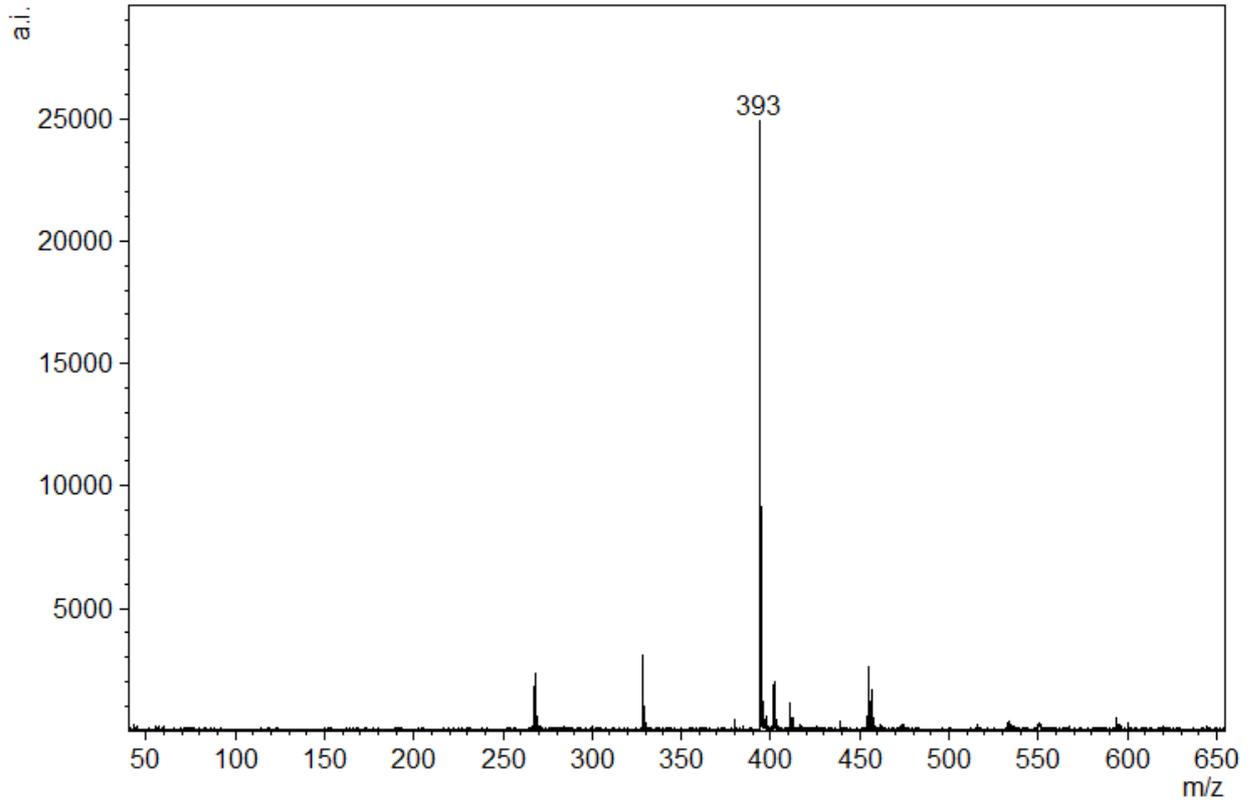
Масс-спектр соединения (2.36)



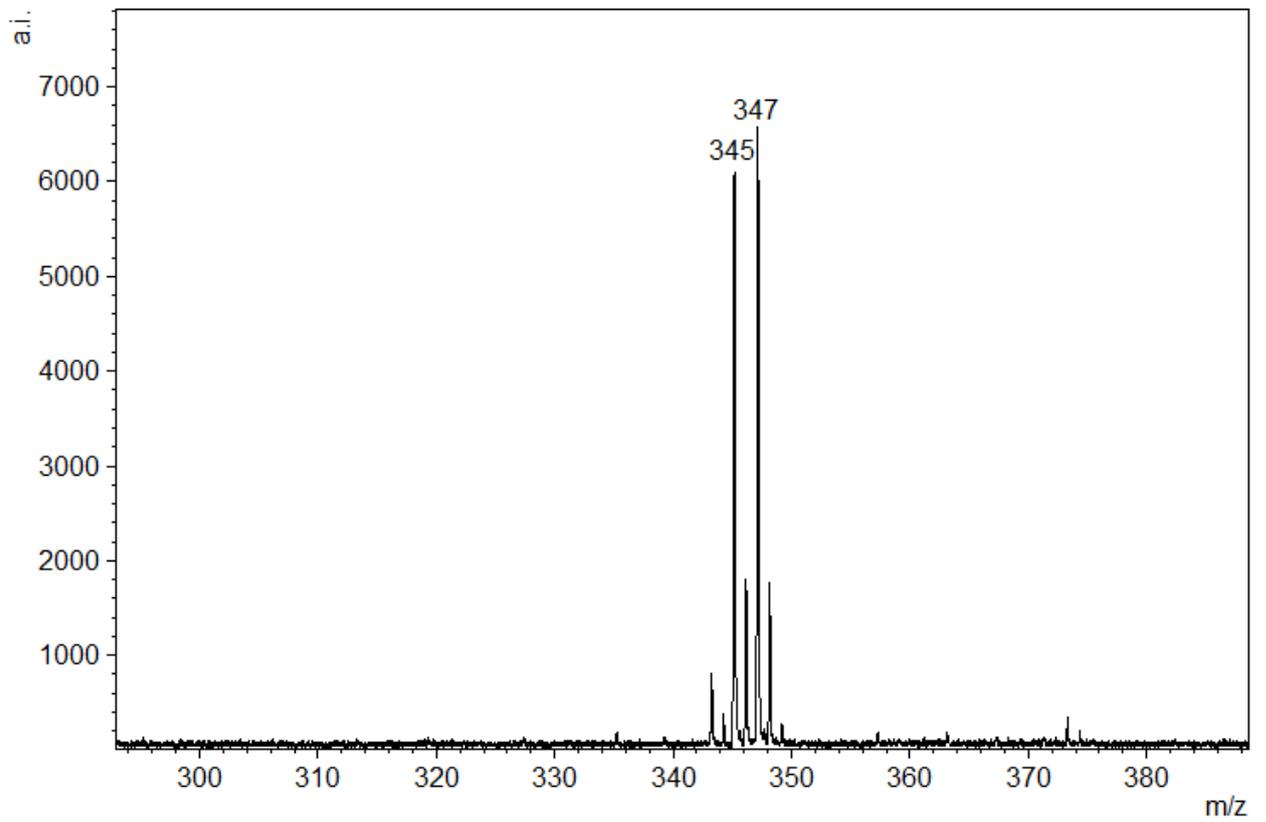
Масс-спектр соединения соединения (2.37)



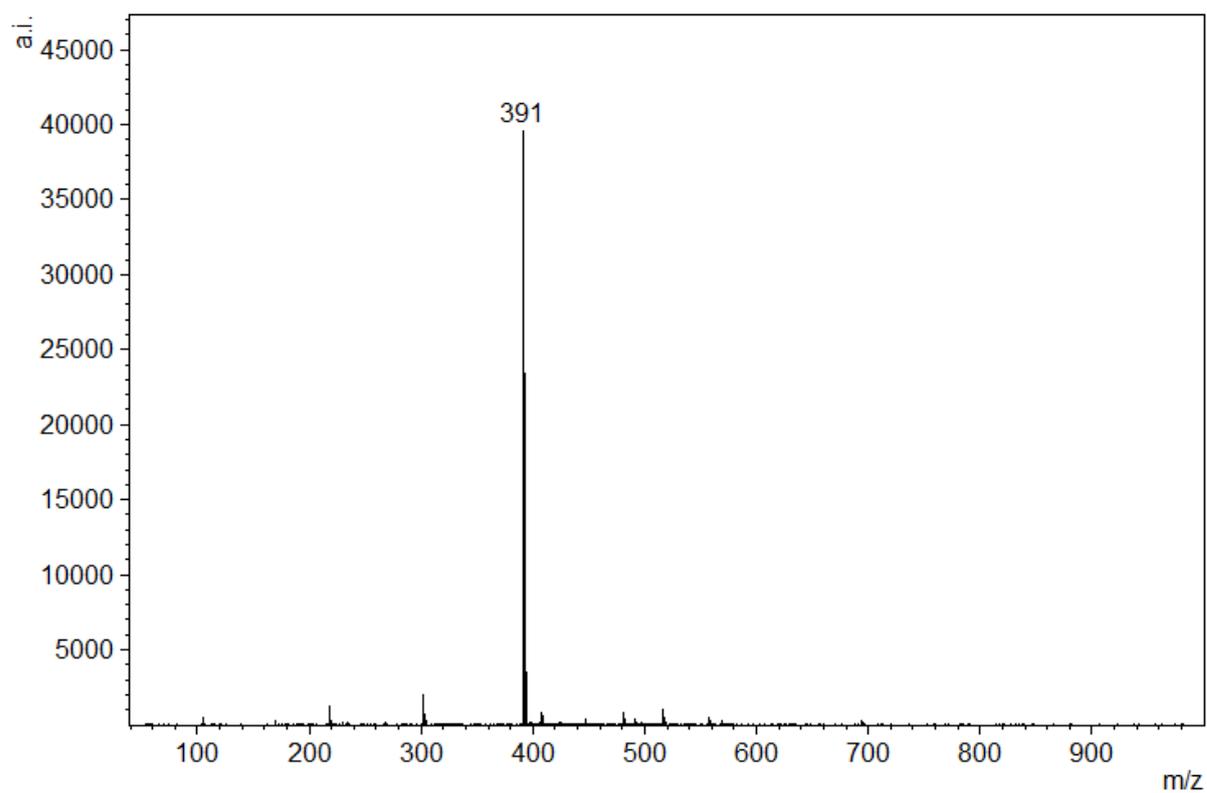
Масс-спектр соединения (2.38)



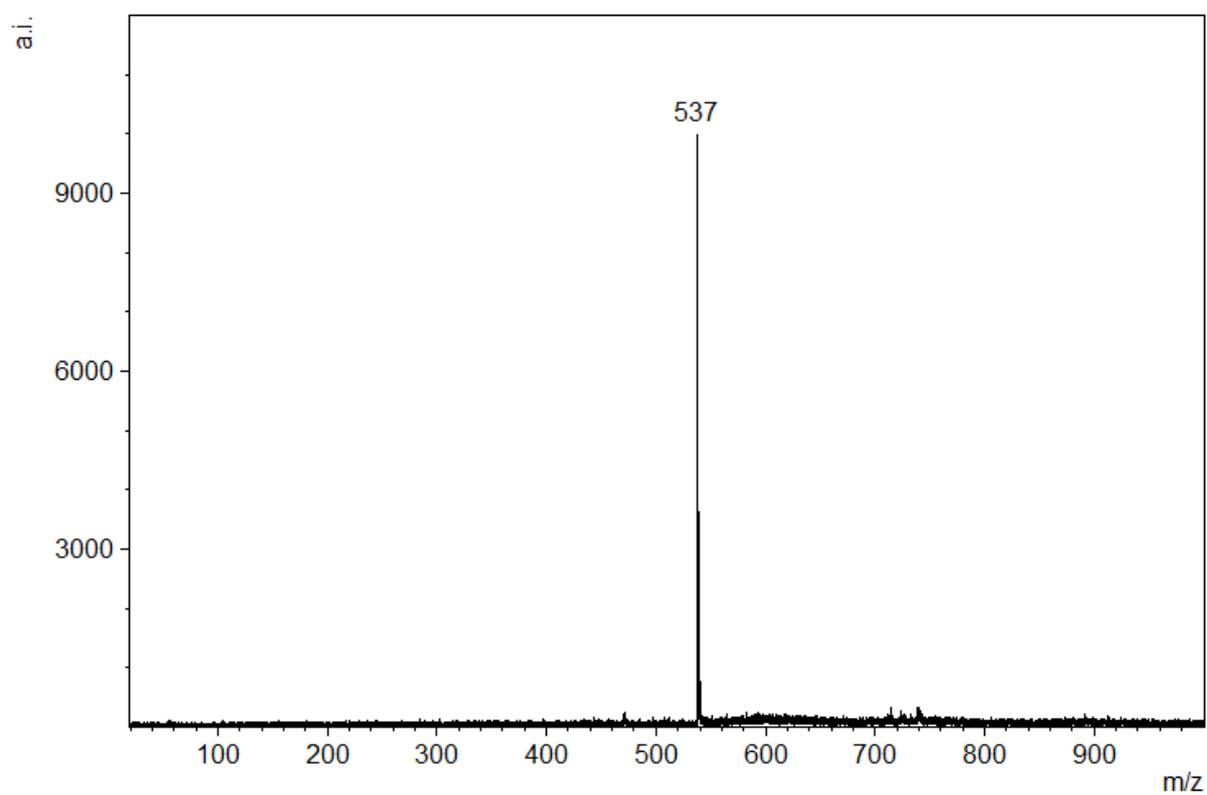
Масс-спектр соединения (2.39)



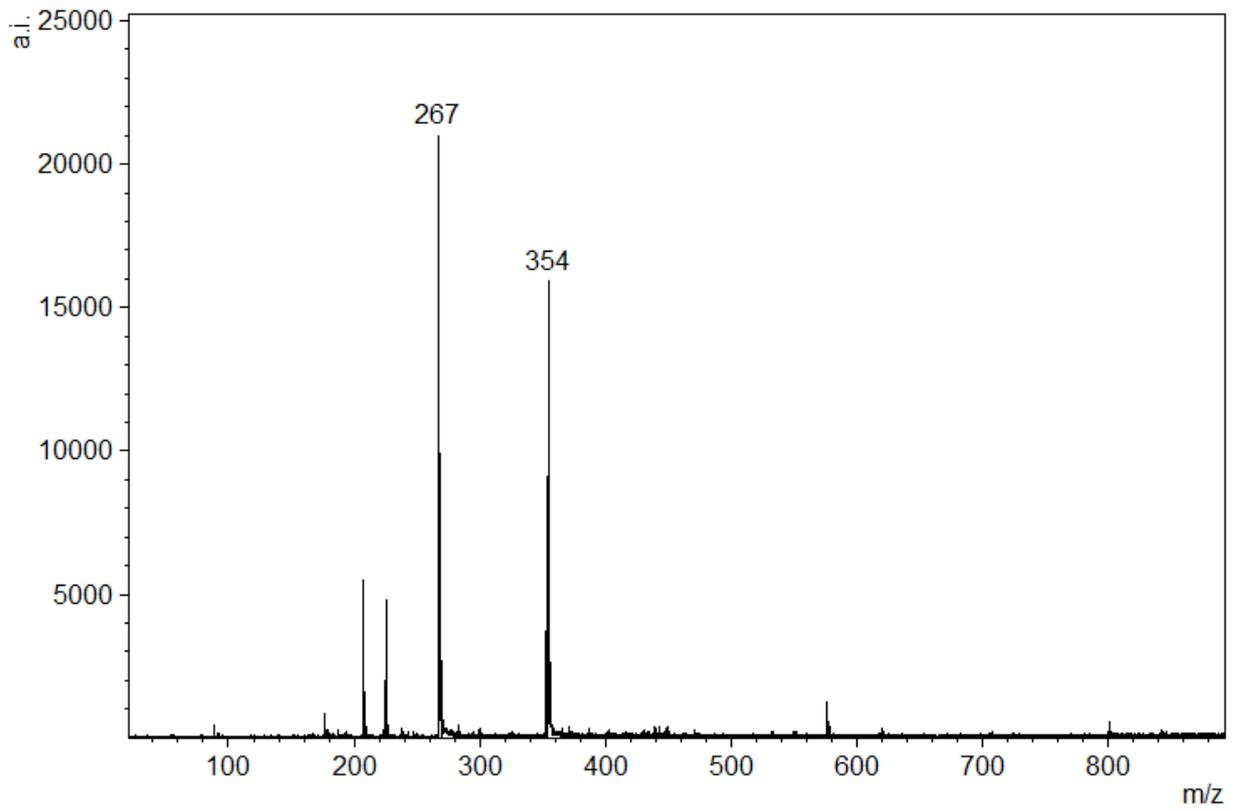
Масс-спектр соединения (2.40)



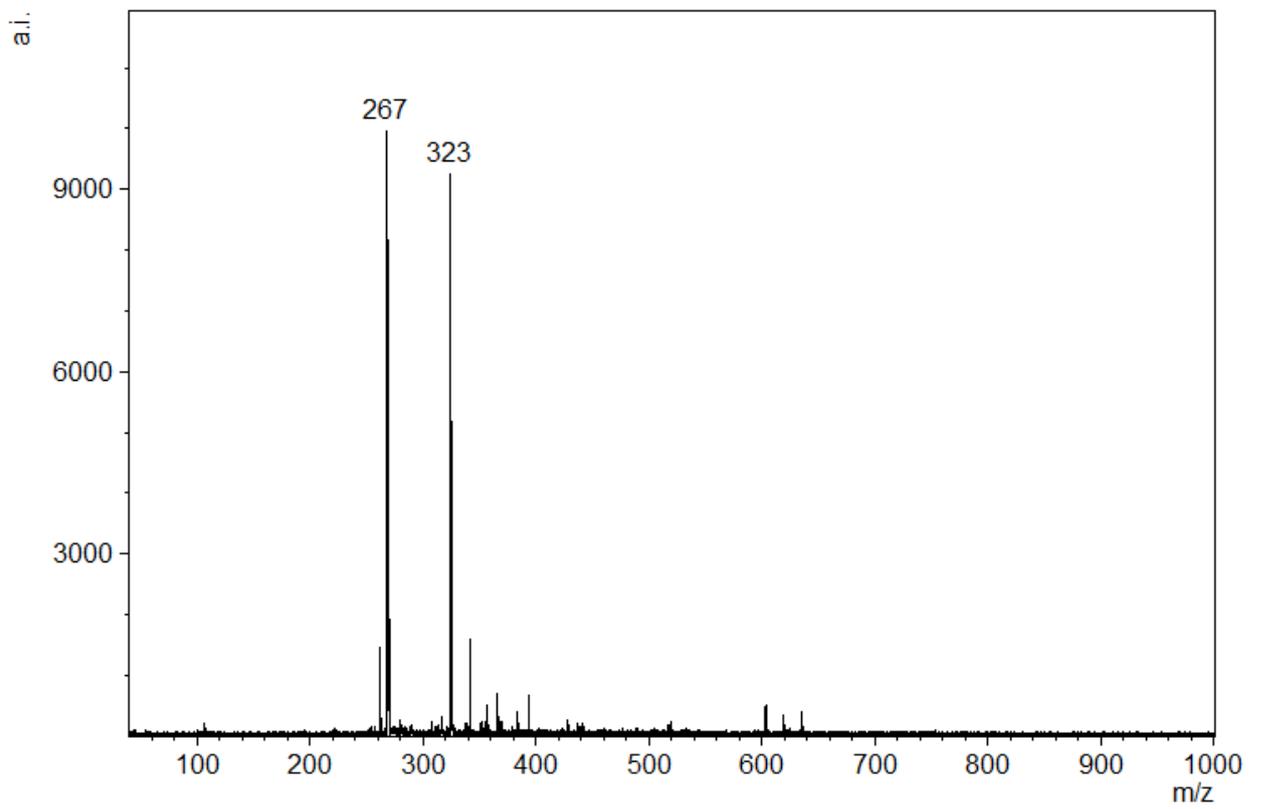
Масс-спектр соединения (2.34)



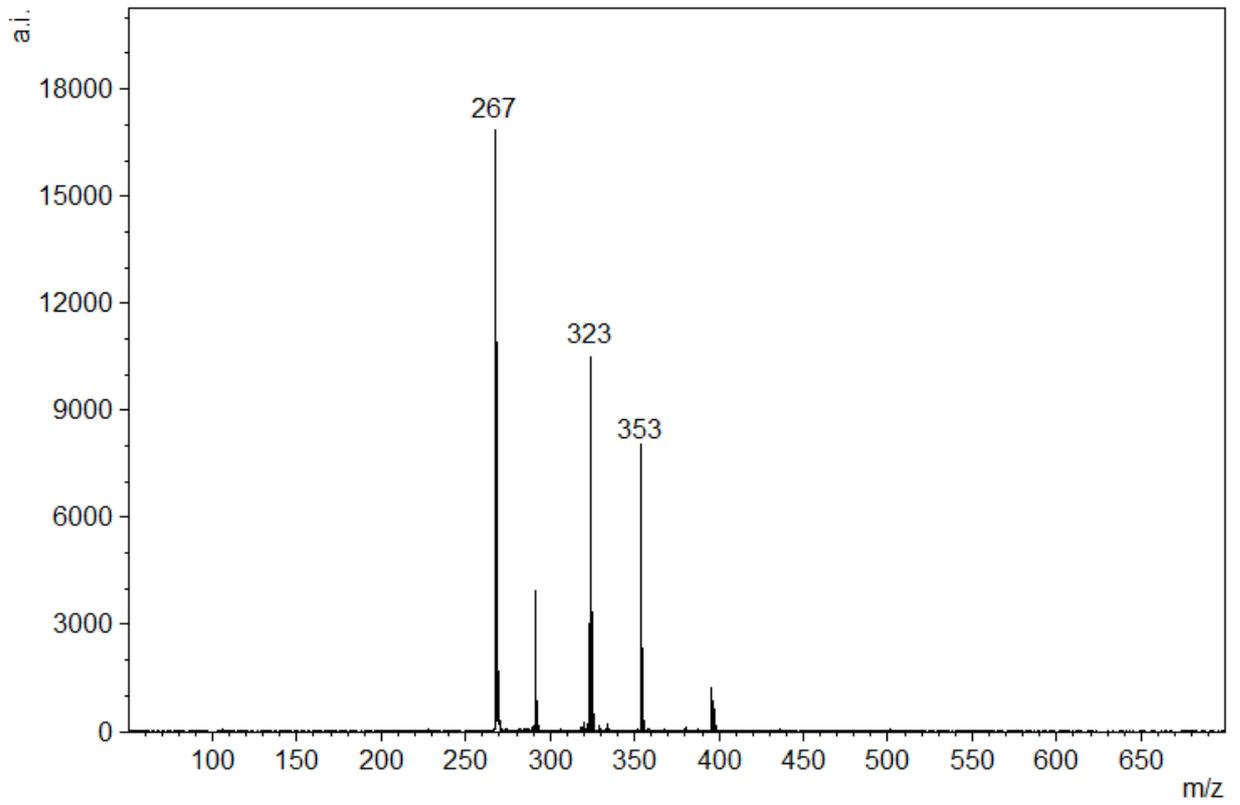
Масс-спектр соединения (2.50)



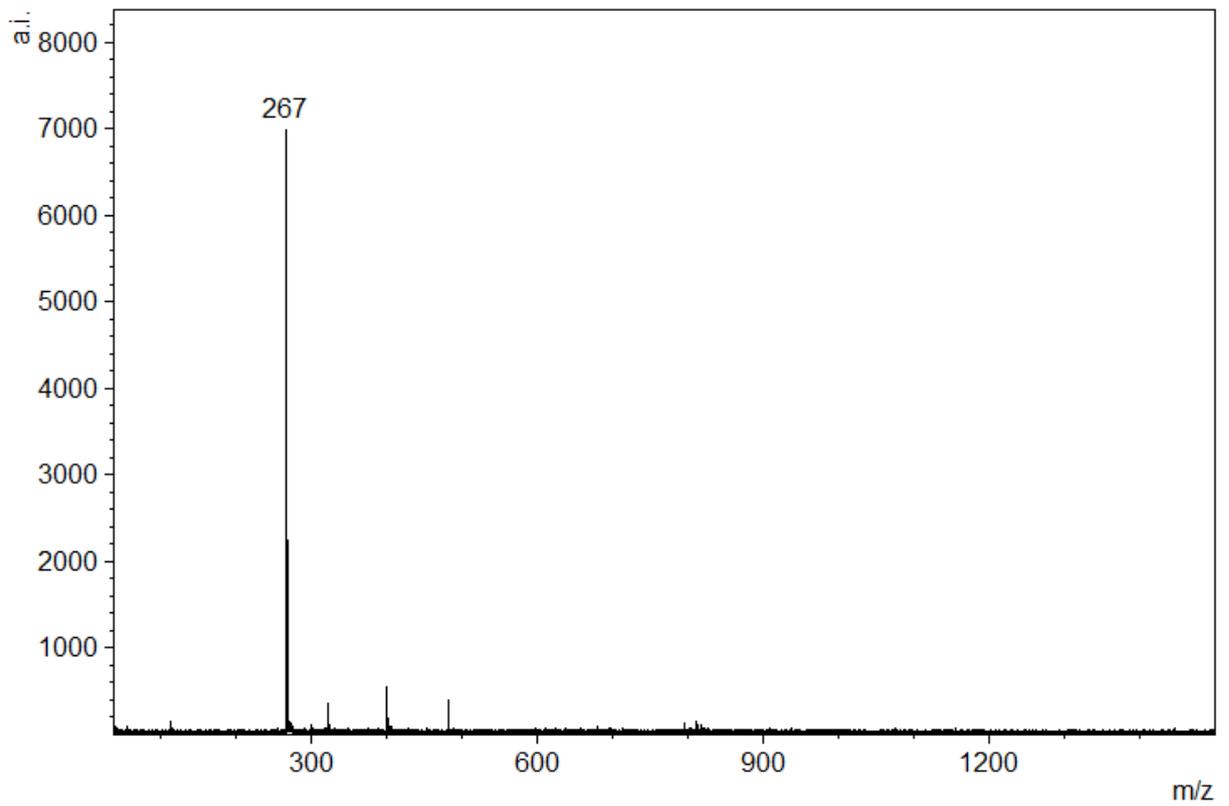
Масс-спектр соединения (2.43)



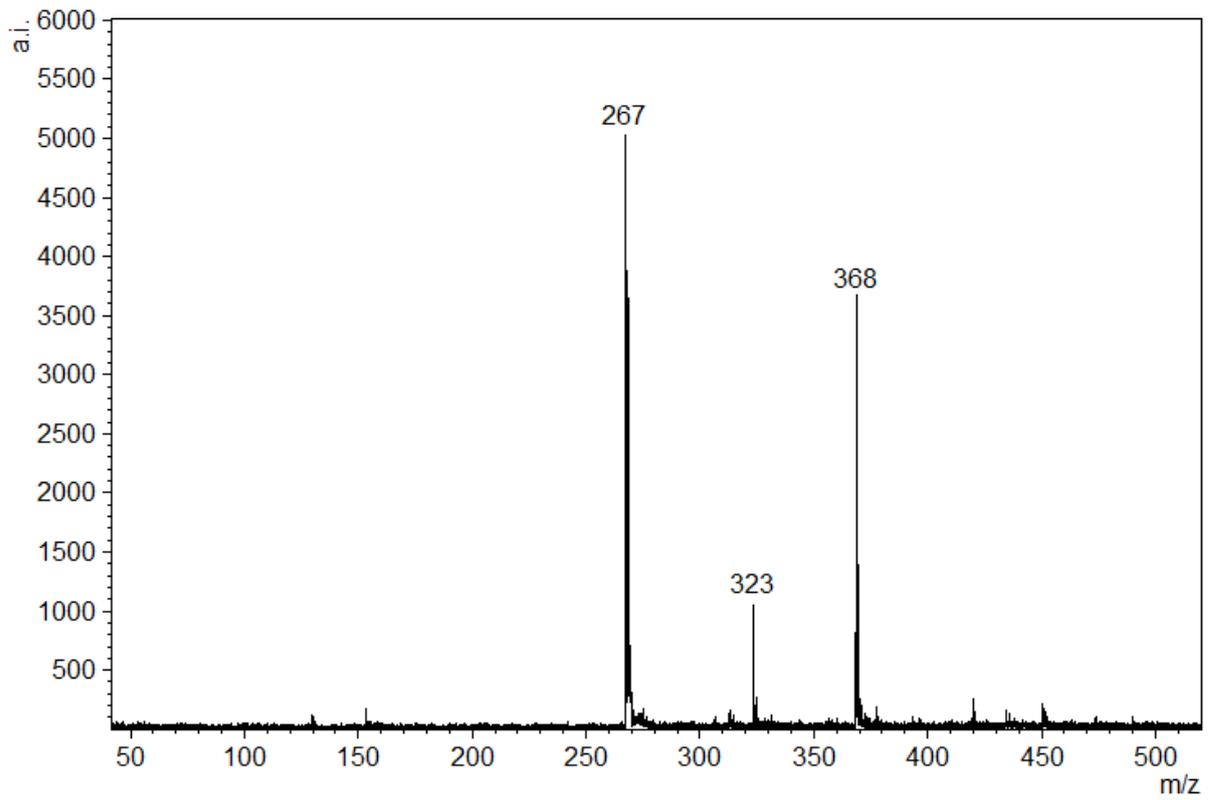
Масс-спектр соединения (2.44)



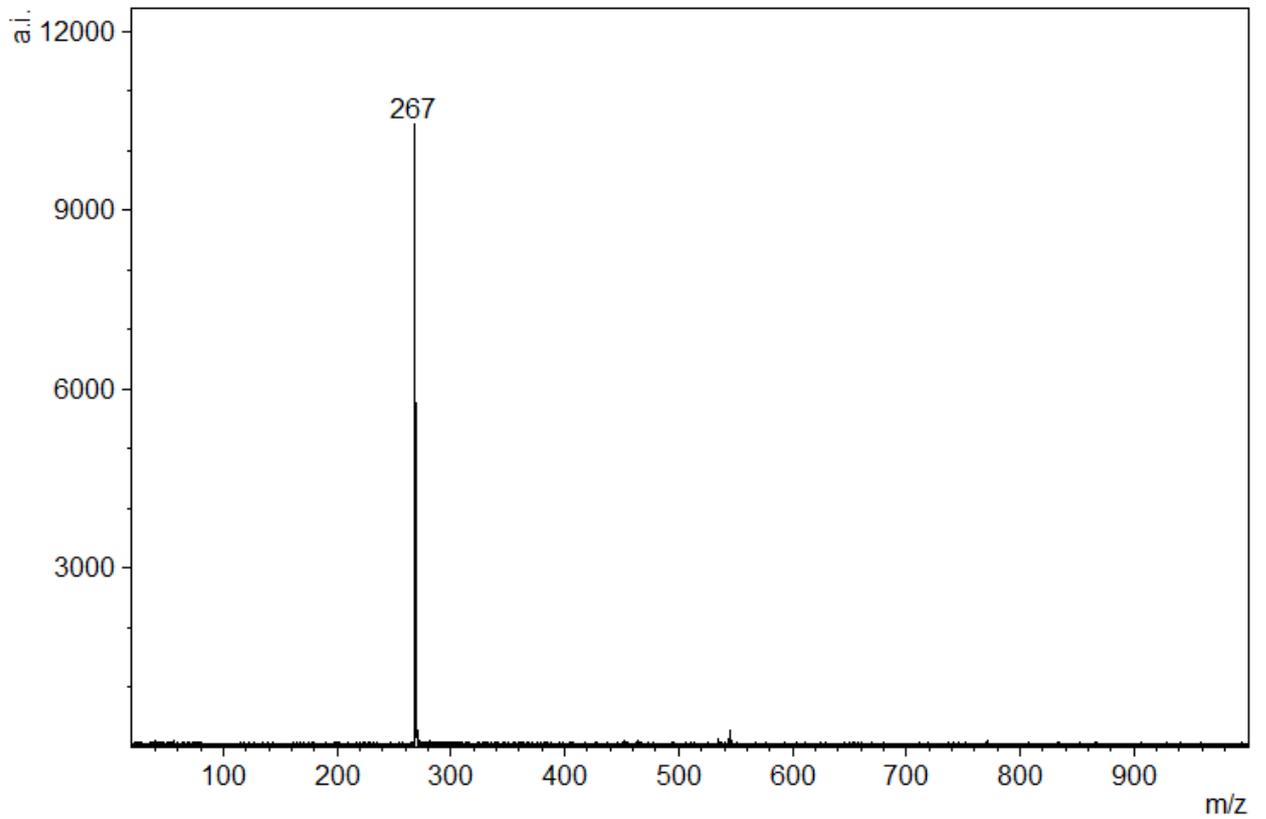
Масс-спектр соединения (2.45)



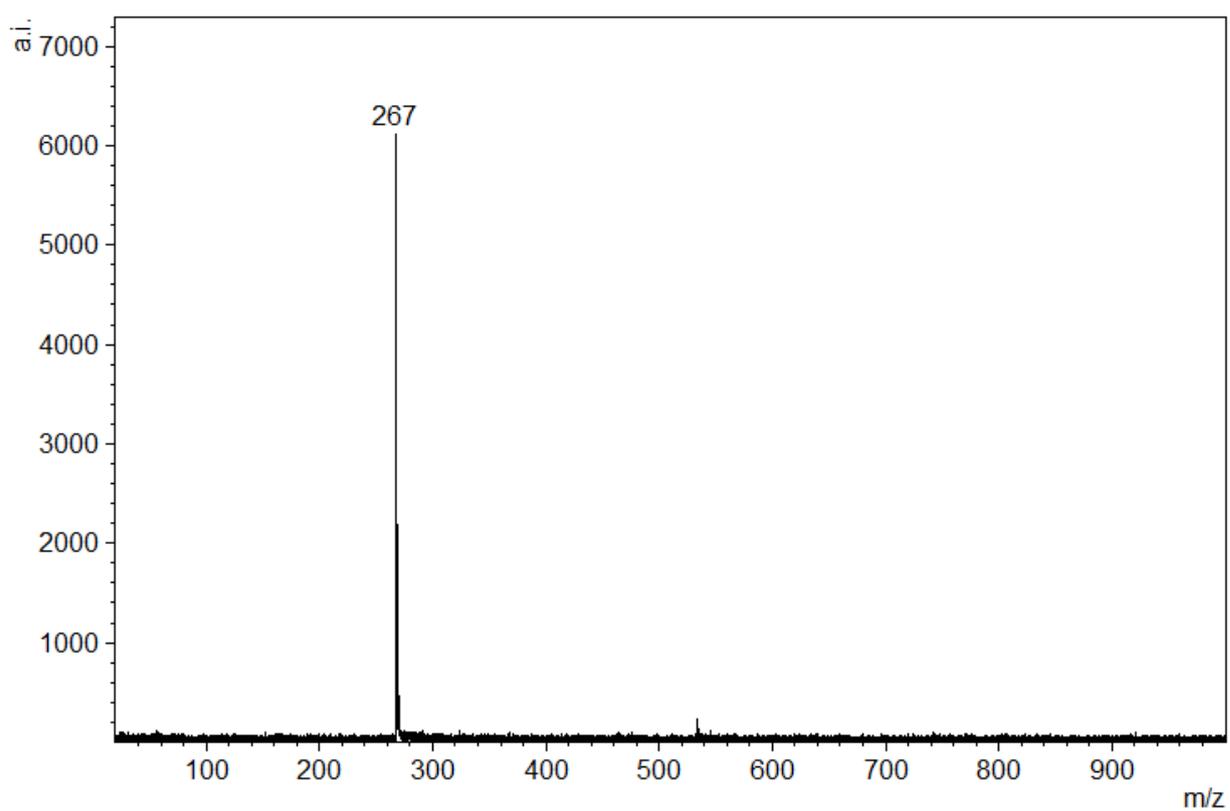
Масс-спектр соединения (2.46)



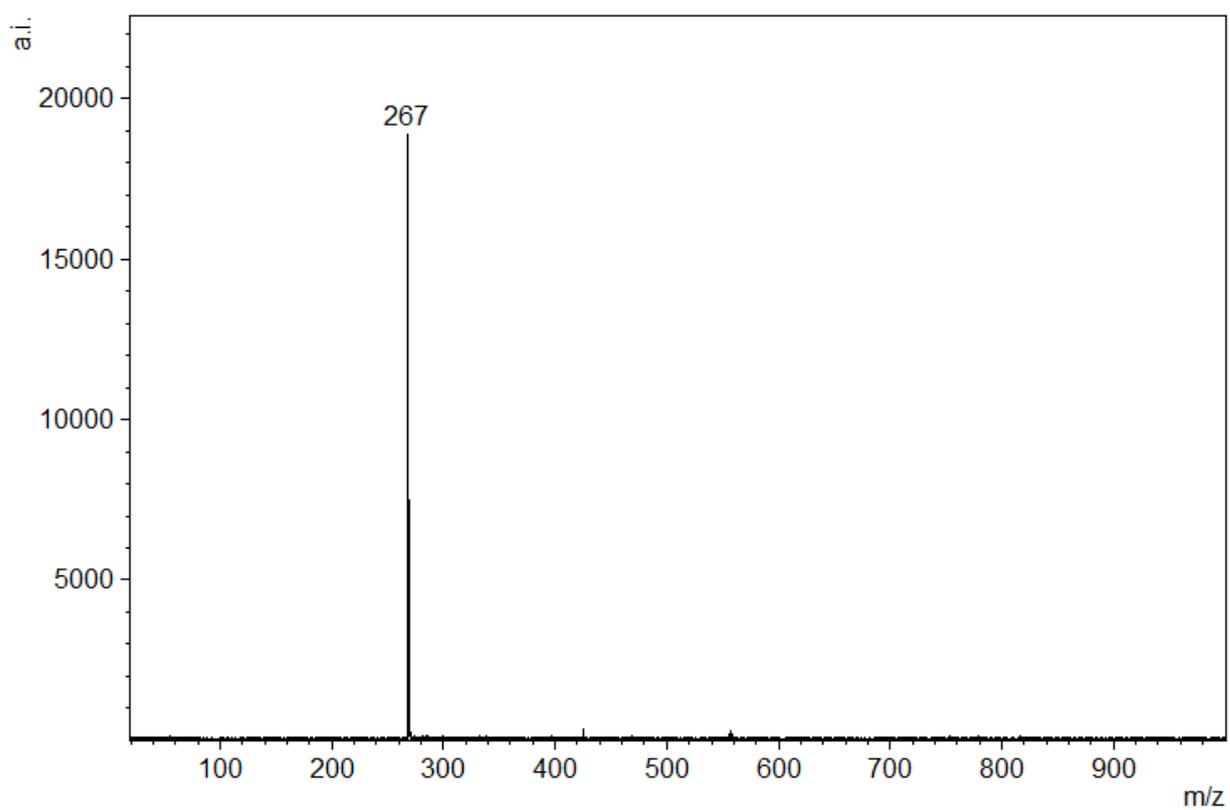
Масс-спектр соединения (2.52)



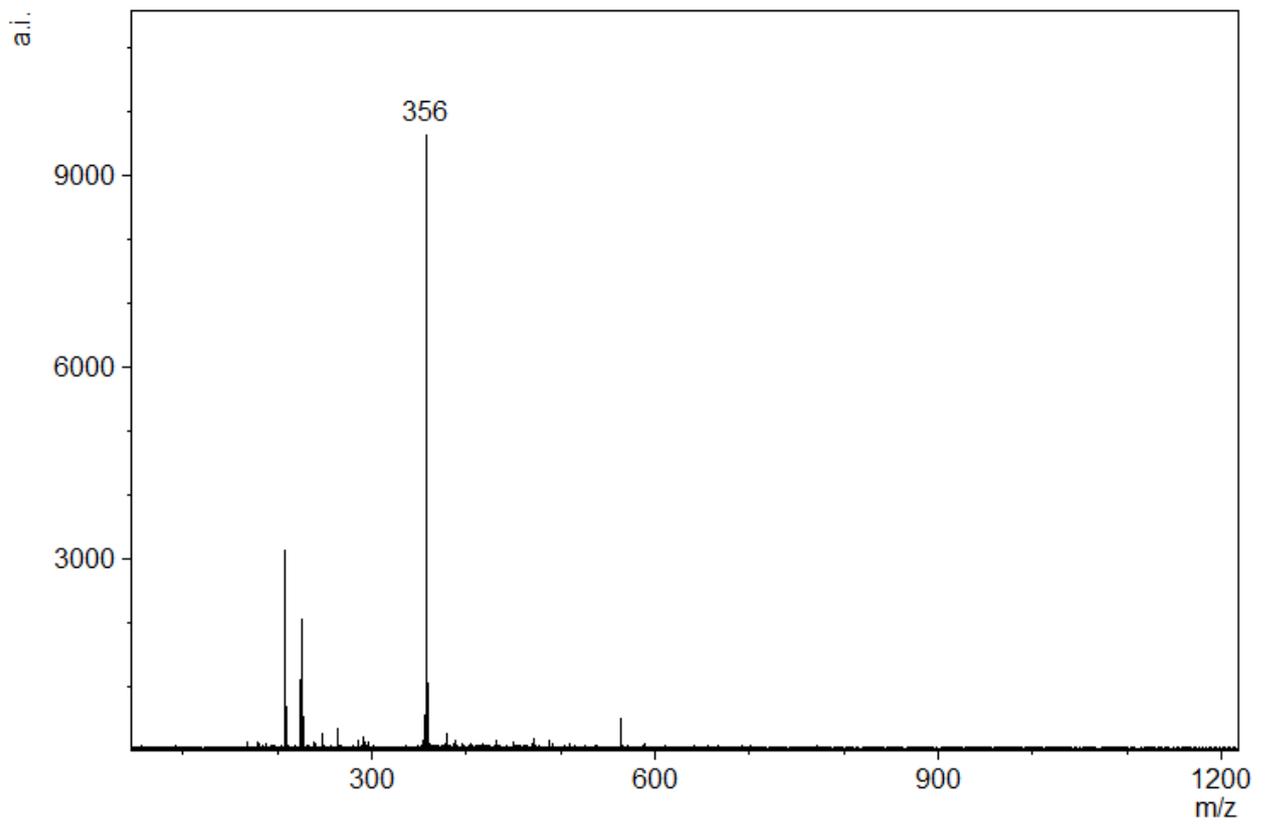
Масс-спектр соединения (2.54)



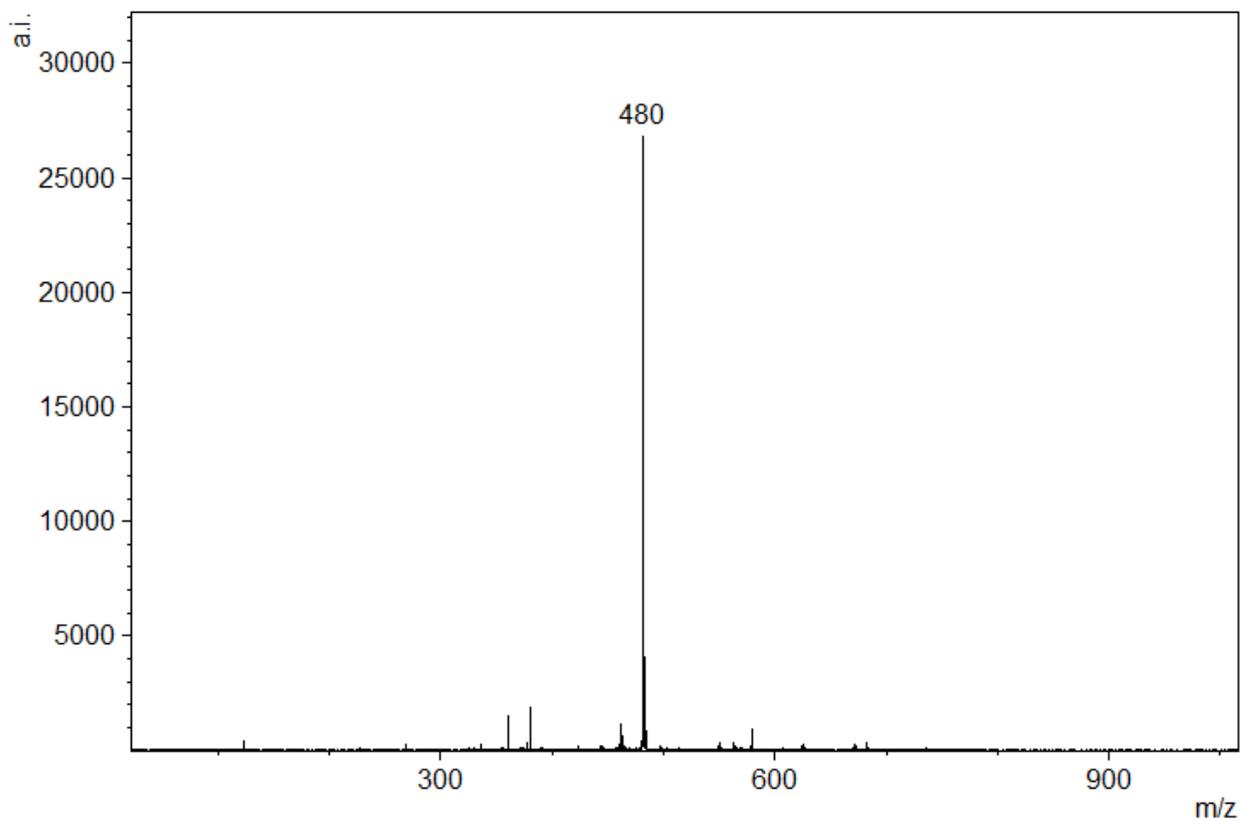
Масс-спектр соединения (2.56)



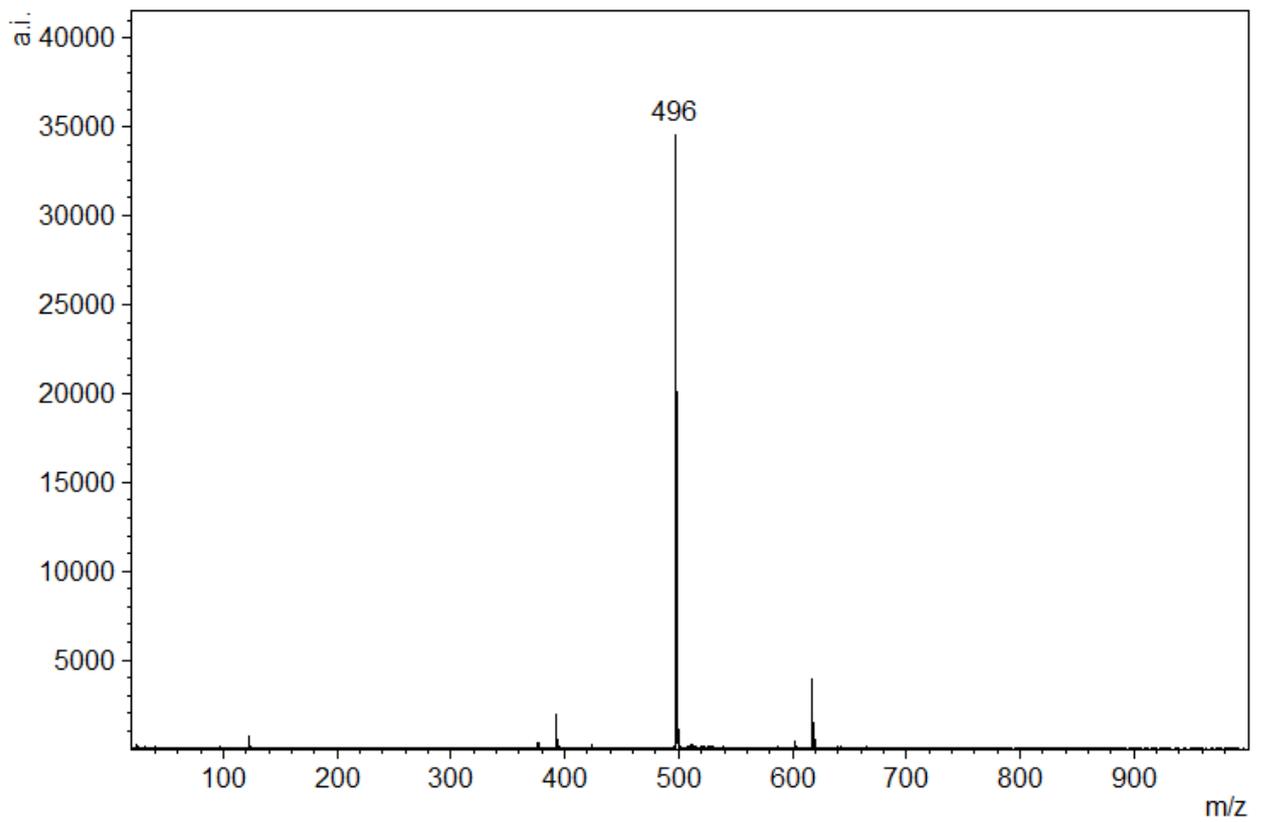
Масс-спектр соединения (2.49d)



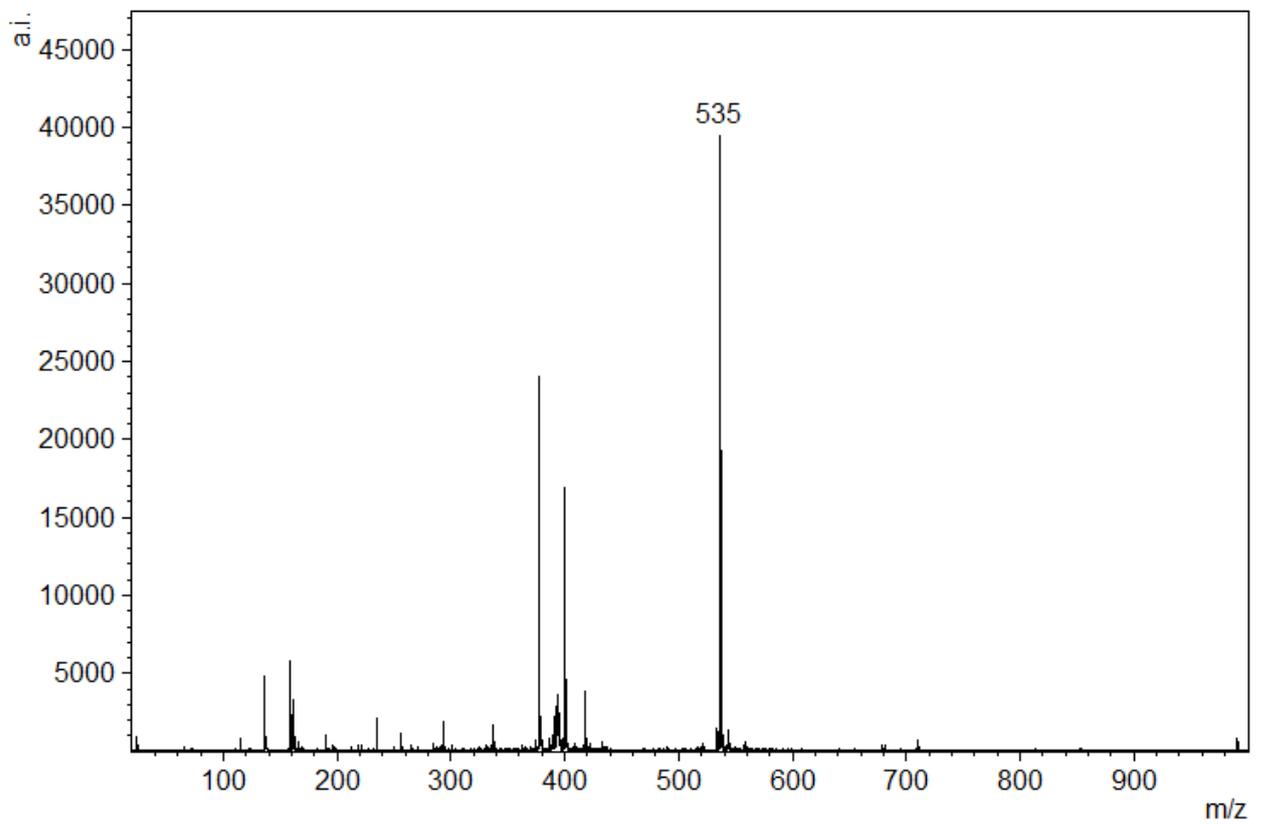
Масс-спектр соединения (2.63)



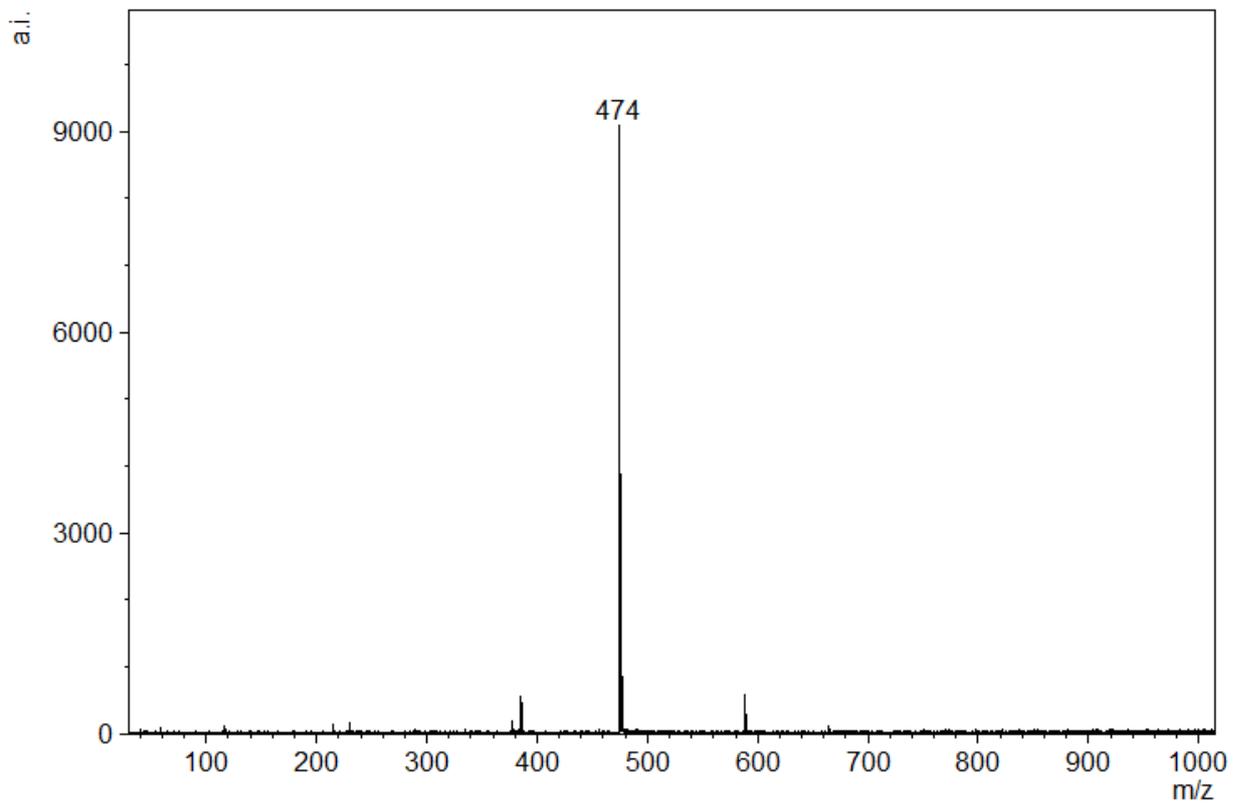
Масс-спектр соединения (2.63)



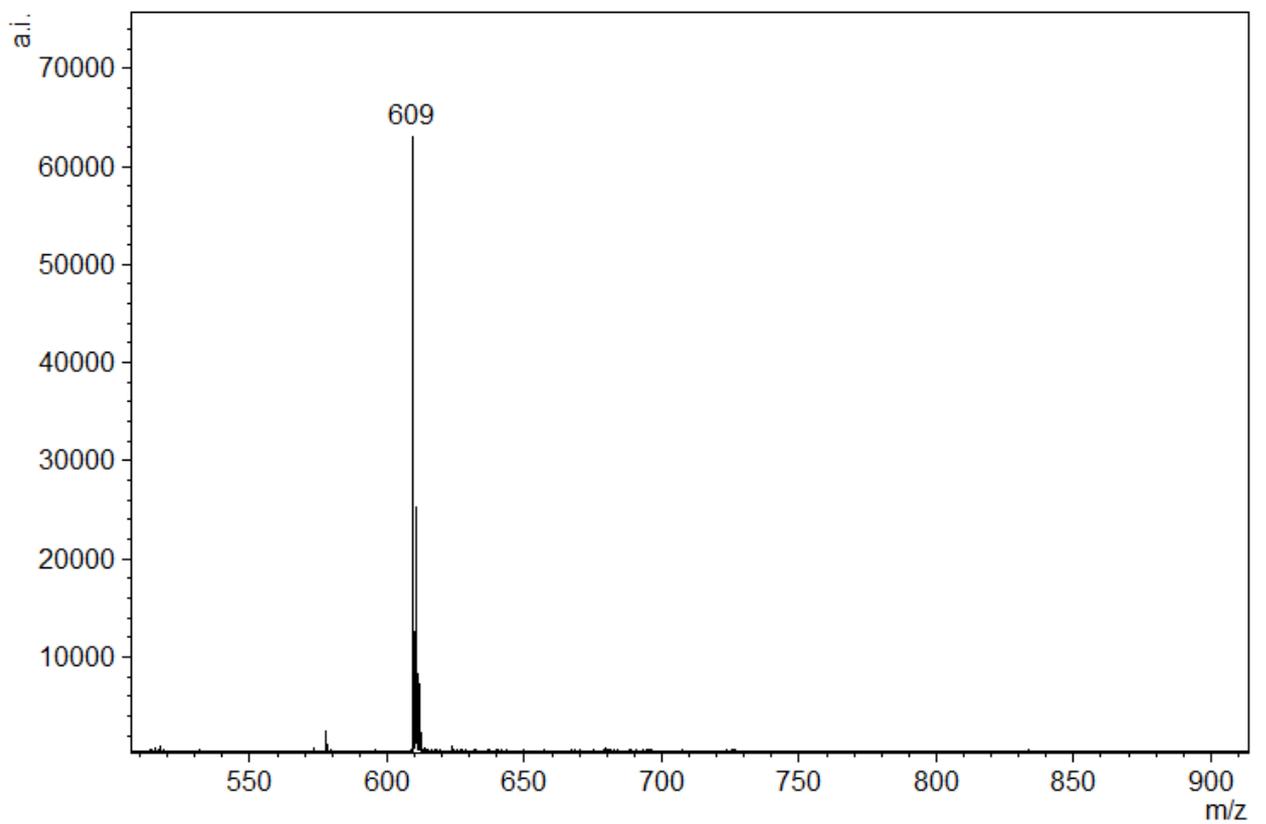
Масс-спектр соединения (2.83)



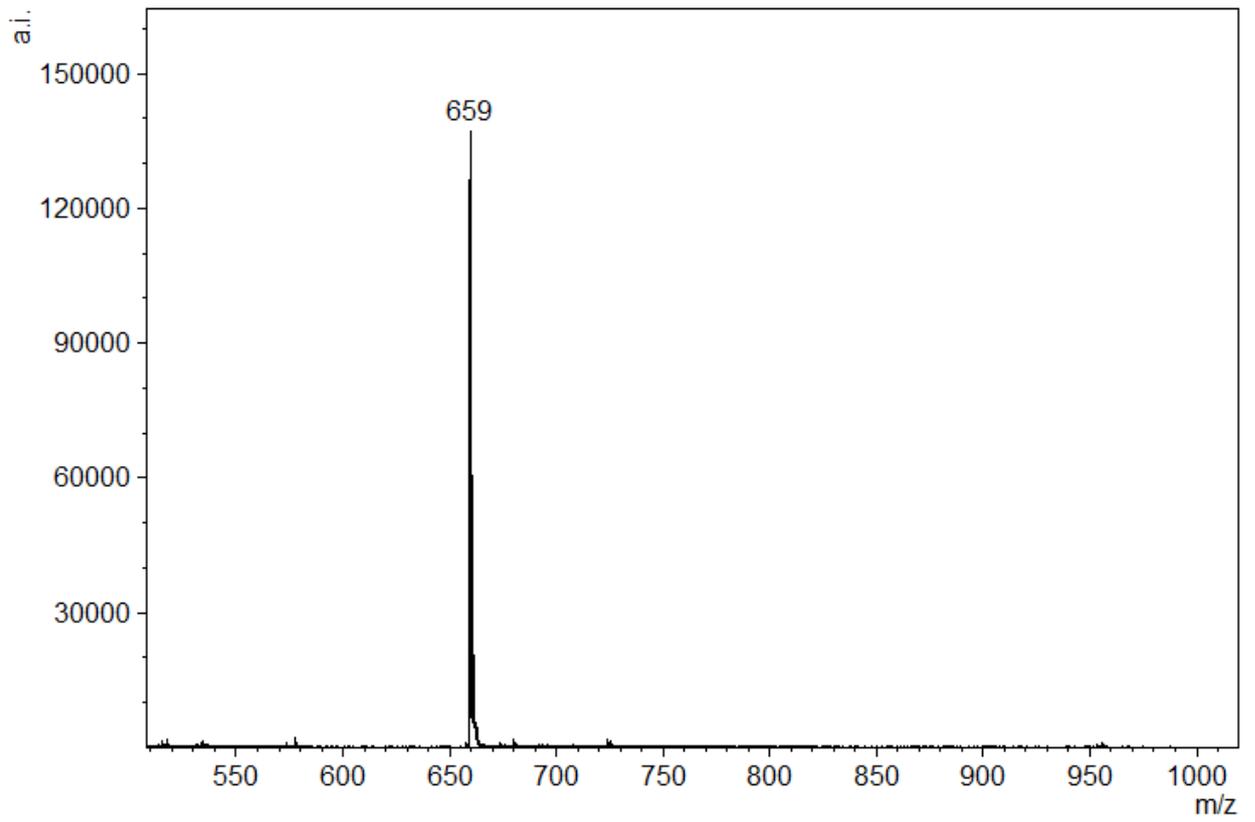
Масс-спектр соединения (2.92)



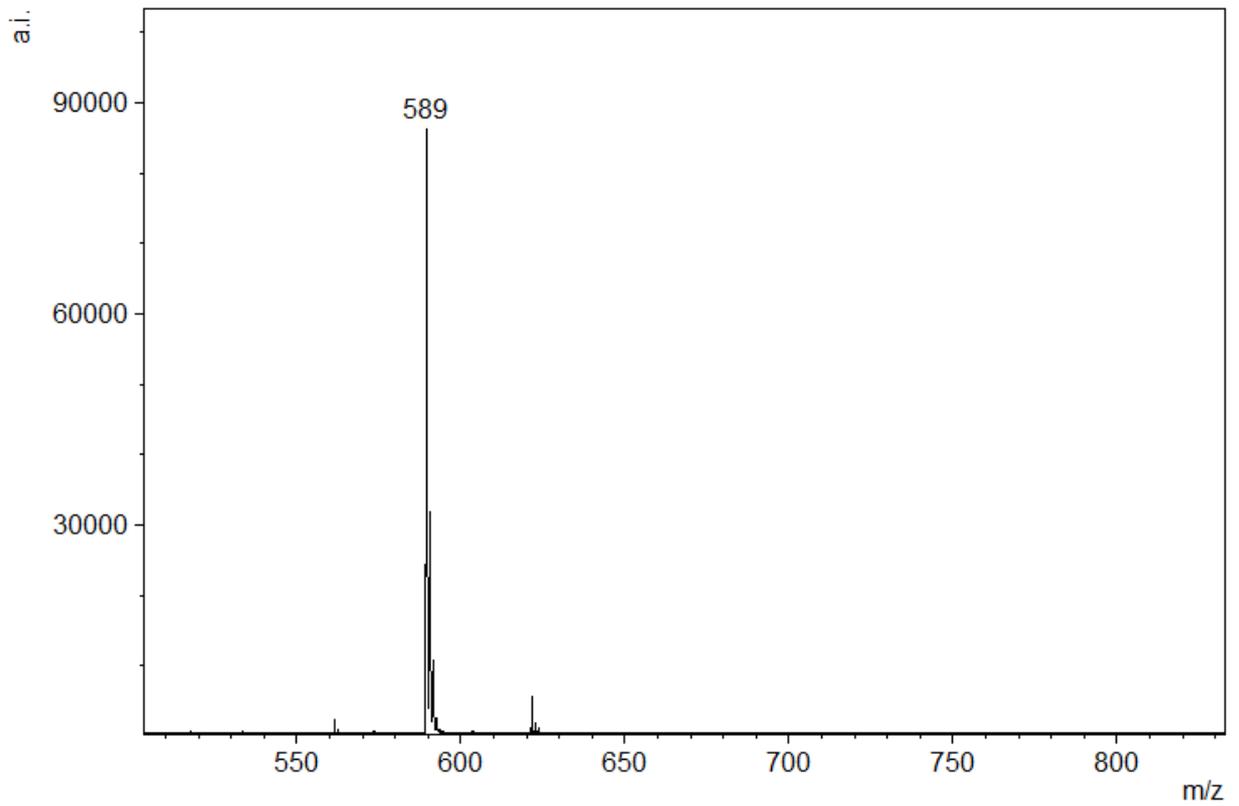
Масс-спектр соединения (2.104)



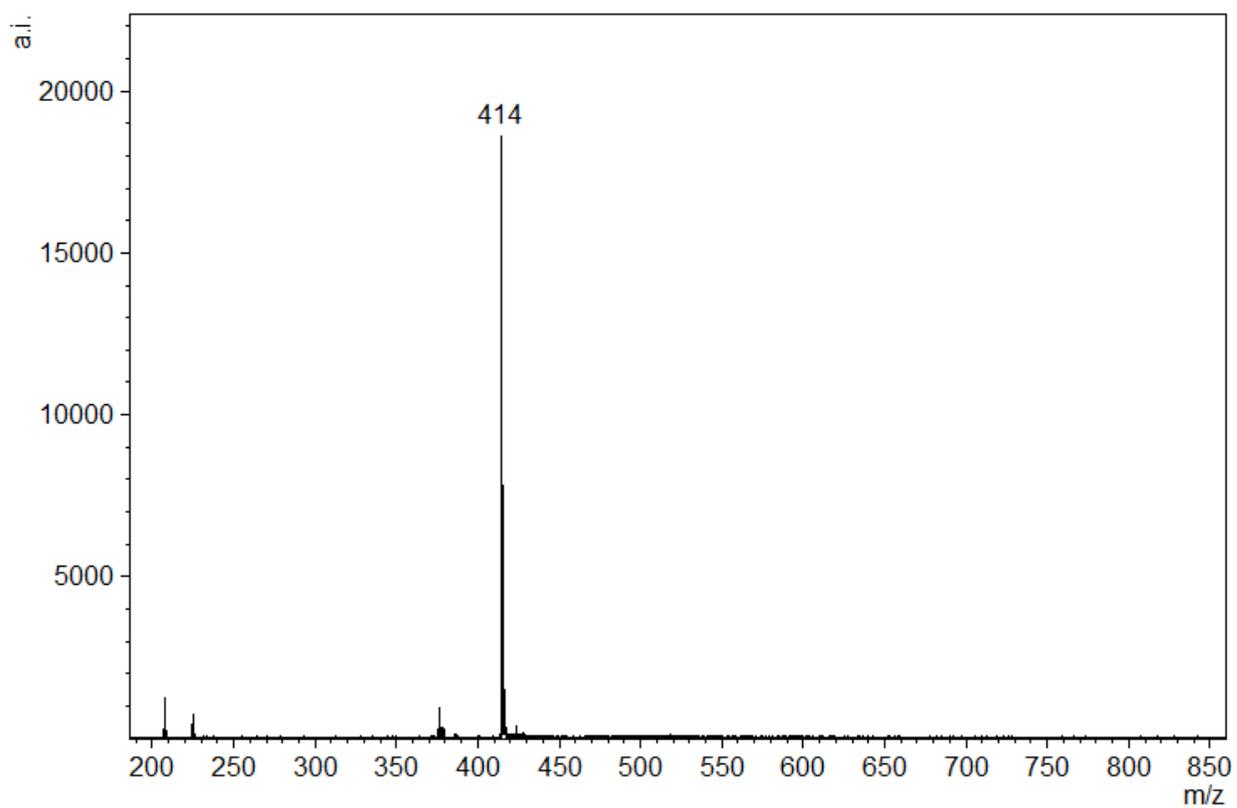
Масс-спектр соединения (2.105)



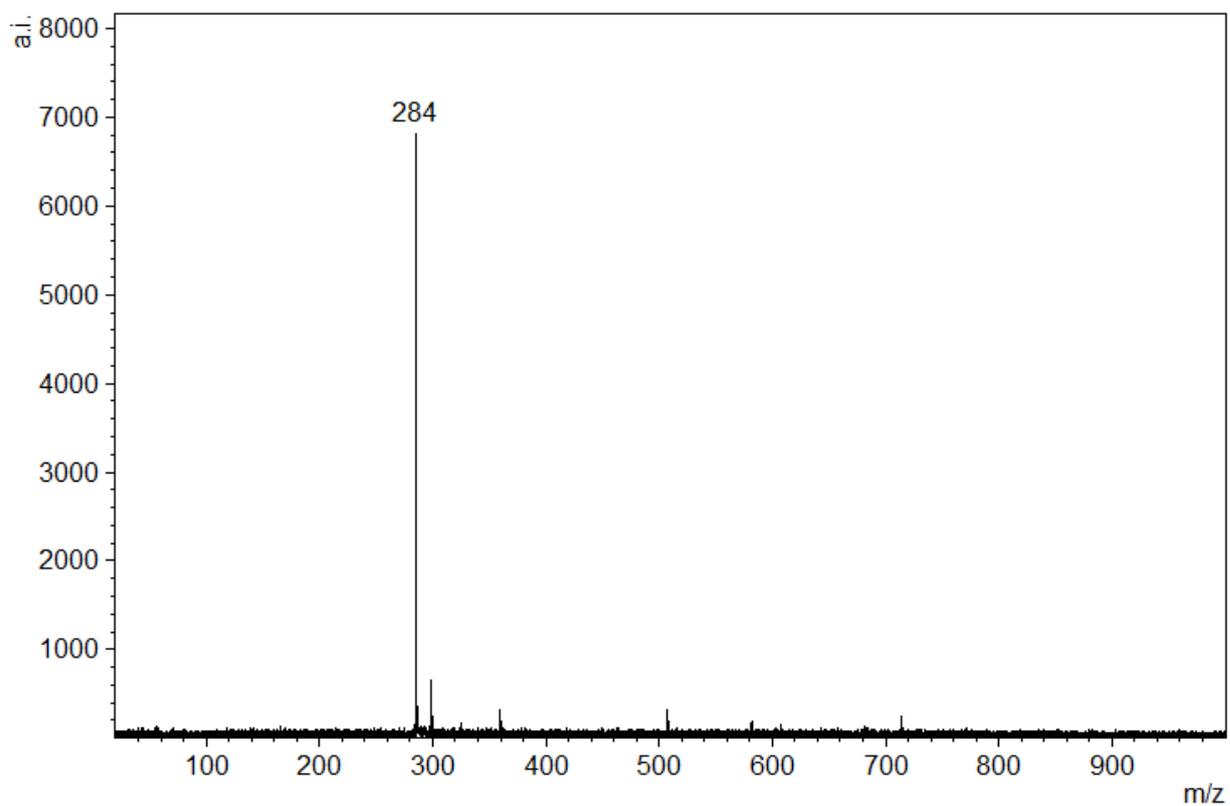
Масс-спектр соединения (2.111)



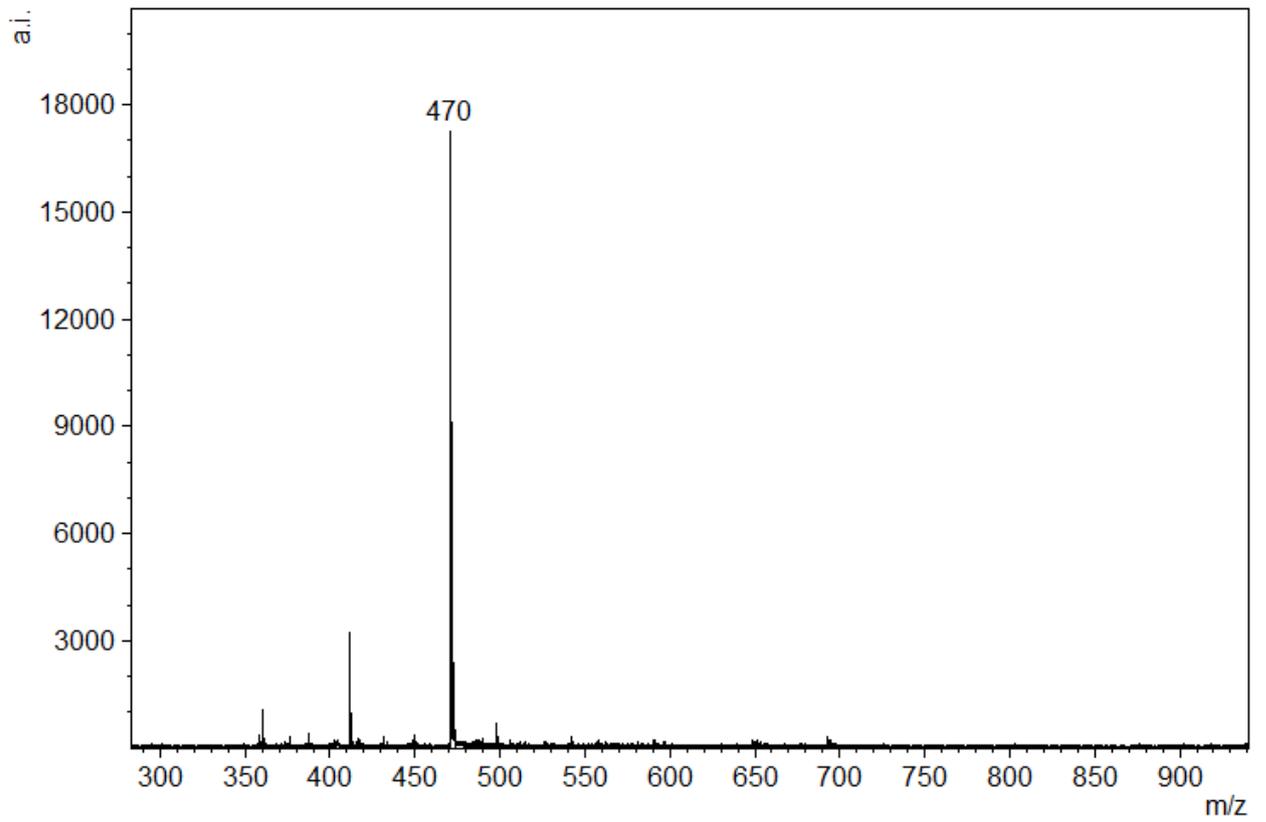
Масс-спектр соединения (2.119)



Масс-спектр соединения (2.120)



Масс-спектр соединения (2.123)



Масс-спектр соединения (2.125)

