



УДК 577(164.12.08+151.33)

НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

XXXVII*. СИНТЕЗ 6-(N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИН-S-ИЛ)
ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА

Литвак Ж. И., Березовский В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Впервые осуществлен синтез 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)флавиномононуклеотида — ацетильного производного природного кофактора бактериальной триметиламинодегидрогеназы, а также ряда его аналогов: 6-нитро-, 6-амино- и 6-бромрибофлавин-5'-фосфатов. Изучены некоторые спектральные свойства полученных соединений.

В последние годы найден новый тип флавиновых коферментов, соединенных с апоферментом эфирной или тиоэфирной связью по положению 6-изоаллоксазиновой молекулы. Так, из гликолатоксидазы печени выделен 6-окси-FMN [2]; из флавопротеида, содержащегося в *Peptostreptococcus elsdenii*, — 6-окси-FAD [2]; из бактериальной триметиламинодегидрогеназы (КФ 1.5.99.7) — 6-цистеин-S-ил-FMN [3, 4]. Нуклеотиды 6-замещенных флавинов до настоящего времени синтезированы не были. Поэтому получение кофакторов на основе природных 6-замещенных флавинов и их аналогов, изучение их химических и физико-химических свойств, фармакологической и биохимической активности представляется весьма актуальным.

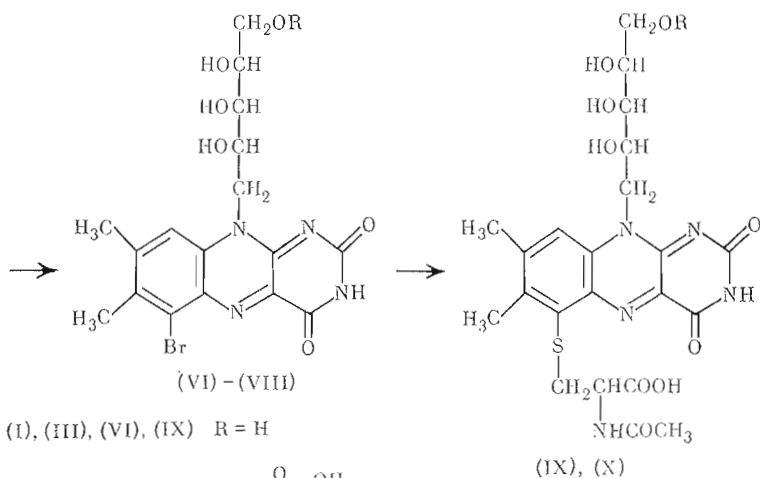
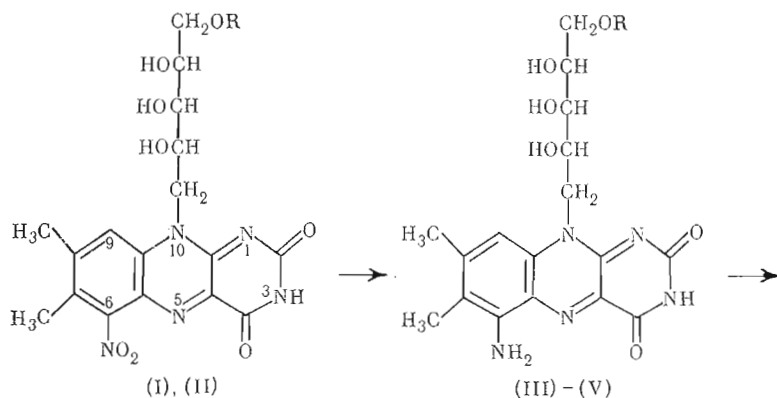
В настоящей работе мы синтезировали 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)флавиномононуклеотид, ацетилированный кофермент триметиламинодегидрогеназы, исходя из 6-нитрорибофлавина (I), полученного нами ранее нитрованием рибофлавина [5]. Первоначально соединению (I) была приписана структура 9-нитрорибофлавина, которая затем была уточнена как 6-нитрорибофлавин [6].

Фосфорилированием 6-нитрорибофлавина (I) по первичной 5'-гидроксильной группе диметилловым эфиром монохлорангидрида ортофосфорной кислоты по методу [7] с последующим гидролизом была выделена смесь, содержащая ~70% 6-нитро-FMN (II) и исходный флавин, который отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25.

6-Нитро-FMN (II) был восстановлен далее гидразингидратом в спиртовой среде в 6-амино-FMN (IV) (см. схему) с выходом 85%. Идентичное соединение получено восстановлением 6-нитрорибофлавина (I) гидразингидратом в 6-аминорибофлавин (III) и последующим фосфорилированием. В этом случае в полученной реакционной смеси содержится 15% исходного вещества, 50% монофосфата (IV) и 33% 6-аминорибофлавин-5'-дифосфата (V); кроме того, на хроматограмме заметно слабое пятно, по подвижности (R_f 0,50) соответствующее, по-видимому, циклофосфату. Используя метод разделения на колонке с ионообменной смолой КУ-2 в H^+ -форме, удалось разделить полученную смесь флавинов и выделить 6-амино-FMN (IV) в индивидуальном виде.

Далее из соединения (IV) заменой аминогруппы на бром был получен 6-бром-FMN (VII). С этой целью 6-амино-FMN (IV) подвергался диазотированию нитритом натрия в среде разбавленной (1:2) бромистоводородной кислоты; полученная соль диазония разлагалась с образованием 6-бром-FMN (VII) с выходом 80%. Интересно, что в разбавленной серной кислоте соль диазония разлагалась с отщеплением диазогруппы и продуктом реакции вместо ожидаемого 6-окси-FMN был незамещенный FMN. Аналогичные превращения наблюдались при попытке получить 6-тио- и

* Предыдущее сообщение см. [1].



(I), (III), (VI), (IX) R = H

(II), (IV), (VII), (X) R = $\text{P}(\text{OH})_2$

(V), (VIII) R = $\text{P}(\text{OH})_2\text{O-P}(\text{OH})_2$

6-алкилтиорибофлавин из 6-аминорибофлавина через соответствующую диазониевую соль [8].

6-Бром-ФМН (VII) мы получили также из 6-аминорибофлавина (III) путем превращения его в соль диазония и далее в 6-бромрибофлавин (VI) с последующим фосфорилированием и разделением смеси образовавшихся моно- и дифосфатов (VII) и (VIII) на колонке с ионообменной смолой КУ-2.

Ранее конденсацией 6-бромрибофлавина с *L*-цистеином в растворе карбоната натрия при pH 10 был получен 6-(*L*-цистеин-*S*-ил)рибофлавин с выходом 35–40% вместе с некоторым количеством 6-(*L*-цистеин-*N*-ил)рибофлавина [8]. С целью избежать образования продукта *N*-присоединения мы вводили в реакцию *N*-ацетил-*L*-цистеин.

Конденсацией 6-бром-ФМН (VII) с *N*-ацетил-*L*-цистеином в водном растворе аммиака мы получили 6-(*N*-ацетил-*L*-цистеин-*S*-ил)-ФМН (X). Спектры поглощения соединения (X) в воде и 3 н. HCl (см. таблицу и «Экспер. часть») близки к спектрам поглощения природного 6-(*L*-цистеин-*S*-ил)-ФМН [3]. 6-(*N*-Ацетил-*L*-цистеин-*S*-ил)-ФМН (X) в отличие от ФМН (pK_a 4,55 и 8,57) является трехосновной кислотой и поэтому на кривой потенциометрического титрования имеет три точки перегиба, соответствующие pK_a 4,45; 6,55 и 8,40 (у *N*-ацетил-*L*-цистеина pK_a 6,50).

Спектры поглощения и флуоресценции 5'-фосфатов флавинов в фосфатном буфере (рН 7)

Соединение	Спектр поглощения				Спектр флуоресценции *	
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-4}$)				$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$I_{\text{отн}}$, %
FMN	223 (2,84)	266 (3,18)	373 (1,04)	446 (1,23)	522	100
6-нитро-FMN (II)	221 (3,29)	268 (3,54)	365 (0,85)	443 (1,23)	518	80
6-амино-FMN (IV)	211 (2,49)	263 (2,20)	290 (1,37)	428 ** (1,90)	520	0,6
6-бром-FMN (VII)	224 (2,81)	270 (3,27)	398 (1,10)	445 (0,97)	522	19,0
6-N-Ас-Cys(S)-FMN (X)	224 (3,13)	269 (3,35)	370 (0,93)	437 (1,23)	520	20,0

* $\lambda_{\text{возб}}$ 445 нм.

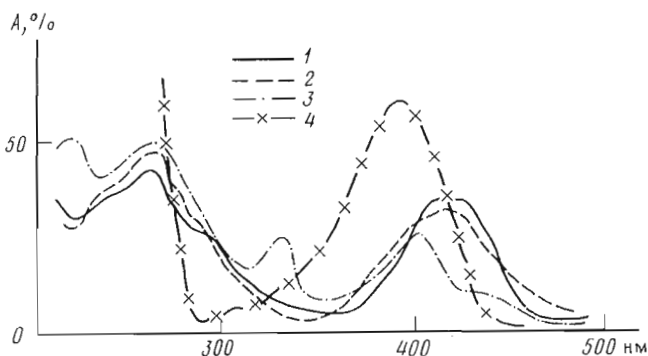
** Характерна дополнительная полоса поглощения $\lambda_{\text{макс}}$ 540—590 нм (ϵ 0,20·10⁴).

6-(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (X) с невысоким выходом образуется также при фосфорилировании соединения (IX); вещество выделено из смеси флавинов разделением на колонке с сефадексом G-25. 6-(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)рибофлавин (IX) был получен нами конденсацией 6-бромрибофлавина (VI) с N-ацетил-L-цистеином в смеси диметилформид — раствор карбоната натрия, рН 10, или при нагревании в водном растворе аммиака.

Структура синтезированных соединений подтверждена данными спектров поглощения в УФ- и видимой области, флуоресценции, ИК-спектров и хроматографии на бумаге.

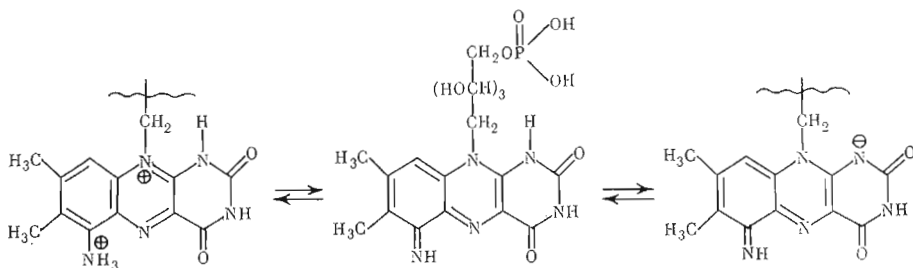
Спектры поглощения и флуоресценции 5'-фосфатов 6-замещенных флавинов (II, IV, VII, X) в нейтральной форме сходны со спектрами соответствующих нефосфорилированных флавинов и отличаются от спектров FMN (таблица). Так, введение в положение 6 молекулы FMN электроотрицательной нитрогруппы вызывает гипсохромный сдвиг второго максимума поглощения в видимой области с 373 до 365 нм, в то время как введение атома брома приводит к значительному bathochromному смещению этой $\pi \rightarrow \pi'$ -полосы поглощения до 398 нм и перераспределению интенсивностей первого и второго максимумов.

Полное перекрыwanie этих полос поглощения наблюдается в спектре 6-амино-FMN (IV), где благодаря наличию сильного электронодонорного заместителя происходит bathochromное смещение второго максимума FMN при 373 нм и гипсохромный сдвиг первого длинноволнового максимума, так что возникает одна интенсивная полоса поглощения в области 420—



Спектры поглощения 6-амино-FMN (IV) в УФ- и видимой областях при рН: 1 — 2—10; 2 — 12 (0,02 н. NaOH); 3 — 0,5 (2 н. HCl); 4 — < -1 (70% HClO₄)

430 нм. В широком диапазоне рН 2–10 спектр поглощения 6-амино-FMN (IV) не меняется, однако в сильноокислых растворах происходит протонирование, длинноволновая полоса поглощения претерпевает гипсохромный сдвиг с увеличением интенсивности (рисунок). Соединение (IV) как в нейтральной, так и в анионной форме (спектры этих двух форм близки), по-видимому, имеет хиноидную «имино»-структуру, в то время как в сильноокислых растворах возникает таутомерная ей протонированная «амино»-форма.



Подобные изменения в зависимости от рН наблюдались в спектрах 6-оксирибофлавина, для которого с использованием N¹-закрепленной структуры был сделан вывод о возможности «окиси-оксо»-таутомерии [2], а также в спектрах 6-аминорибофлавина (III), для которого предложена хиноидная структура анионной и нейтральной форм [8].

В спектре 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (X) происходит гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы, что вызывает частичное появление полос поглощения в этой области.

Все 6-замещенные флавины при возбуждении УФ- или видимым светом имеют характерную желто-зеленую флуоресценцию. Однако некоторые заместители сильно уменьшают интенсивность флуоресценции в водных растворах соединений (IV), (VII), (X) (см. таблицу).

В ИК-спектрах дифосфатов (V), (VIII) наблюдается интенсивная полоса 945 см⁻¹, отвечающая асимметричным валентным колебаниям P—O—P-пирофосфатной связи.

Изучена хроматографическая подвижность 6-замещенных FMN. Значения R_f для фосфатов (II), (IV), (VII), (X) при хроматографировании на бумаге в системе пиридин — изопропиловый спирт — вода — уксусная кислота (33 : 33 : 33 : 1) ниже, чем для соответствующих нефосфорилированных флавинов (см. «Экспер. часть») (R_f FMN ниже R_f рибофлавина в той же системе).

Изучение влияния 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (X) на активность гликогенфосфорилазы Б (КФ 2.4.1.1) из скелетных мышц кролика показало, что это соединение является примерно в 3 раза более слабым ингибитором, чем FMN [9].

Экспериментальная часть

УФ- и видимые спектры поглощения сняты на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония). ИК-спектры получены на спектрофотометре Perkin — Elmer 180 (США) в суспензии в вазелиновом масле. Спектры флуоресценции сняты на приборе Hitachi MPF-2A (Япония), концентрация 0,01 г/л, длина волны возбуждения 445 нм. Хроматографию проводили на бумаге FN-11 (ГДР) в восходящем потоке в системе пиридин — изопропиловый спирт — вода — уксусная кислота, 33 : 33 : 33 : 1. Потенциометрическое титрование проводили на приборе «рН 340» (СССР).

6-Нитро-FMN (II). К 3 мл диметилового эфира монохлорангидрида ортофосфорной кислоты [7] постепенно прибавляли 1 г 6-нитрорибофлавина (I) и выдерживали при перемешивании 3 ч при 45° С, при этом образовывалась густая вязкая масса. Смесь охлаждали, добавляли 2,4 мл воды и нагревали 30 мин при 80° С. После охлаждения приливали 16 мл бута-

нола, через 20 ч выпавший осадок отфильтровывали, промывали спиртом. Получали 750 мг смеси, которая содержала ~70% соединения (II) и исходный флавиин, R_f 0,74. Смесь наносили на колонку (5×110 см) с сефадексом G-25, элюировали водой со скоростью 1,5 мл/мин, фракции контролировали хроматографией на бумаге. Фракции с R_f 0,66 упаривали в вакууме при 40°С, остаток растирали с безводным спиртом, промывали эфиром, сушили. Получали 490 мг (41%) 6-нитро-FMN (II) в виде желтого кристаллического вещества. Найдено, %: С 40,30; Н 4,19; N 13,20; Р 6,50. $C_{17}H_{20}N_5O_{11}P$. Вычислено, %: С 40,73; Н 4,02; N 13,97; Р 6,18.

6-Аминорибофлавин (III). К суспензии 0,5 г 6-нитрорибофлавина (I) в 50 мл этилового спирта и 20 мл воды добавляли 2 мл гидразингидрата, нагревали при кипении 1 ч, охлаждали. Получали 6-аминорибофлавин (III). Выход 85%, темно-коричневые кристаллы, R_f 0,65, $\lambda_{\text{макс}}$ 211, 263, 290, 428 нм (в воде). Лит. данные [8]: 428 нм (рН 7,0).

6-Амино-FMN (IV). а) К суспензии 0,5 г 6-нитро-FMN (II) в 50 мл этилового спирта и 20 мл воды добавляли 2 мл гидразингидрата, смесь нагревали при кипении 1 ч, охлаждали, отфильтровывали осадок, промывали его спиртом, эфиром, сушили. Получали 6-амино-FMN (IV) в виде аммониевой соли. Выход 85%, темно-коричневые кристаллы, R_f 0,46.

б) К 3 мл диметилового эфира монохлорангидрида ортофосфорной кислоты прибавляли 1 г 6-аминорибофлавина (III) и выдерживали 3 ч при 45°С. После обработки, описанной для соединения (II), получали 900 мг смеси, содержащей 15% исходного соединения (III), 50% монофосфата (IV) и 33% дифосфата 6-аминорибофлавина (V). Смесь флавинов наносили на колонку (5,5×115 см) с КУ-2 (Н⁺), элюировали водой со скоростью 1 мл/мин, фракции контролировали хроматографией на бумаге. Получали 120 мг (12%) соединения (III); фракции с R_f 0,46 содержали 450 мг (38%) 6-амино-FMN (IV). Найдено, %: С 43,34; Н 4,85; N 13,89; Р 6,91. $C_{17}H_{22}N_5O_9P$. Вычислено, %: С 43,32; Н 4,70; N 14,86; Р 6,57. Фракции с R_f 0,40 содержали 300 мг (21%) 6-аминорибофлавин-5'-дифосфата (V), спектр поглощения (в воде): $\lambda_{\text{макс}}$ 211, 263, 290, 428 и 560 нм. Найдено, %: С 37,34; Н 4,63; N 12,04; Р 11,09. $C_{17}H_{23}N_5O_{12}P_2$. Вычислено, %: С 37,03; Н 4,19; N 12,70; Р 11,25.

6-Бромрибофлавин (VI). Растворяли 0,22 г 6-аминорибофлавина (III) в 5 мл разбавленного НВг (1:2) и диазотировали 0,3 мл 10% водного раствора нитрита натрия при 0–5°С. Оставляли на 1 ч при 20°С, выпавший желтый осадок отделяли, промывали водой до нейтральной реакции фильтрата, спиртом, сушили. Получали 0,17 г (66%) 6-бромрибофлавина (VI), $\lambda_{\text{макс}}$ 268, 397 и 445 нм (в воде), R_f 0,85. Лит. данные [8]: $\lambda_{\text{макс}}$ 397 и 445 нм. Найдено, %: С 44,65; Н 4,14; Вг 17,00; N 11,28. $C_{17}H_{19}BrN_4O_6$. Вычислено, %: С 44,85; Н 4,21; Вг 17,55; N 12,30.

6-Бром-FMN (VII). а) Растворяли 0,5 г 6-амино-FMN (IV) в 10 мл разбавленного НВг (1:2) и диазотировали 0,3 мл 10% раствора нитрита натрия в воде при 0–5°С. Раствор соли диазония выдерживали 1 ч при 20°С, водным аммиаком доводили рН до 5–6, добавляли спирт до появления осадка. Осадок отделяли, промывали спиртом, получали соединение (VII). Выход 0,45 г (80%), желтое кристаллическое вещество, R_f 0,46. Найдено, %: С 36,64; Н 4,25; N 10,44; Р 6,02. $C_{17}H_{20}BrN_4O_9P \cdot H_2O$. Вычислено, %: С 36,90; Н 4,00; N 10,13; Р 5,60.

б) Фосфорилировали 1 г 6-бромрибофлавина (VI) по методу, описанному для соединения (II); получали 900 мг смеси флавинов, содержащей 6-бром-FMN (VII), дифосфат (VIII) и исходный флавиин (VI). Разделение проводили на колонке с ионообменной смолой КУ-2 (Н⁺) в воде, выделяли 450 мг (38%) монофосфата (VII) и 320 мг (23%) дифосфата (VIII), R_f 0,39. Найдено, %: С 31,88; Н 3,91; Вг 12,26; N 8,29; Р 9,13. $C_{17}H_{21}BrN_4O_{12}P_2 \cdot 2H_2O$. Вычислено, %: С 32,24; Н 3,66; Вг 12,62; N 8,85; Р 9,78.

6-(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)рибофлавин (IX). а) Растворяли 2 мг 6-бромрибофлавина (VI) в 6 мл DMF, добавляли 50 мл 0,1 н. карбоната натрия и раствор 485 мг N-ацетил-L-цистеина в 8 мл воды, предварительно доведенный до рН 9 концентрированным NaOH. Смесь оставляли в тем-

ноте на 20 ч, нейтрализовали уксусной кислотой до pH 7, упаривали в вакууме до объема 20 мл, фильтровали. Для очистки от неорганических солей наносили на колонку (1×10 см) с флоризилом, промывали 5% CH₃COOH (50 мл), водой (50 мл), флавин вымывали с колонки 20% пиридином, растворитель упаривали досуха, остаток обрабатывали спиртом, сушили. Получали соединение (IX). Выход 2 мг, λ_{макс} 268, 370, 437 нм (в воде), R_f 0,52.

б) Смесь 200 мг 6-бромрибофлавина (VI), 1 г N-ацетил-L-цистеина и 20 мл 10% водного аммиака нагревали 10 мин при 80° С, охлаждали, упаривали досуха в вакууме при 20° С, остаток растворяли в воде и снова упаривали, повторяя процедуру несколько раз, затем обрабатывали спиртом. Получали 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)рибофлавин (IX). Выход (240 мг) количественный, R_f 0,52. Найдено, %: С 48,84; Н 5,36; N 12,44. C₂₂H₂₇N₃O₉S. Вычислено, %: С 49,16; Н 5,06; N 13,02.

6-(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (X). а) Смесь 100 мг 6-бром-FMN (VII), 600 мг N-ацетил-L-цистеина и 10 мл 10% раствора аммиака нагревали 10 мин при 80° С, охлаждали, упаривали в вакууме при 20° С, остаток выливали в 100 мл спирта. Выпавший осадок отделяли, промывали спиртом, эфиром, сушили. Выход диаммониевой соли соединения (X) 100 мг (84%), желтое кристаллическое вещество, R_f 0,30, λ_{макс} 220, 263, 405 нм в 3 н. HCl. Для анализа вещество очищали переосаждением спиртом из водного раствора. Найдено, %: С 40,76; Н 5,17; N 15,81. C₂₂H₃₄N₇O₁₂PS. Вычислено, %: С 40,55; Н 5,25; N 15,05.

б) Фосфорилировали 250 мг 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)рибофлавина (IX) как описано для соединения (II); получали сложную смесь, содержащую моно- и дифосфаты соединения (IX), а также продукты их дезацетилирования. Смесь разделяли на колонке с сефадексом G-25 (2×55 см), элюировали водой. Фракции с R_f 0,30 фильтровали, упаривали досуха, остаток обрабатывали спиртом, сушили. Получали 50 мг (16%) 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (X).

ЛИТЕРАТУРА

1. Жилина Т. А., Березовский В. М. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1565–1571.
2. Mayhew S. I., Whitfield C. D., Ihisla S., Schuman-Jornes M. Eur. J. Biochem., 1974, в. 44, № 2, р. 579–591.
3. Steenkamp D. J., Kenney W. C., Singer T. P. J. Biol. Chem., 1978, в. 253, № 8, р. 2812–2817.
4. Steenkamp D. J., McIntire W., Kenney W. C. J. Biol. Chem., 1978, в. 253, № 8, р. 2818–2824.
5. Литвак Ж. И., Березовский В. М. Журн. орган. химии. 1978, т. 14, № 2, с. 440–446.
6. Knappe W. R. Lieb. Ann. Chem., 1979, № 7, р. 1067–1080.
7. Березовский В. М., Артемкина Р. В., Хомутова Е. Д. Журн. общ. химии, 1964, т. 34, № 8, с. 2791–2796.
8. Ihisla S., Kenney W. C., Knappe W. R., McIntire W., Singer T. P. Biochemistry, 1980, в. 19, № 12, р. 2537–2544.
9. Клинов С. В., Чебогарева Н. А., Курганов Б. И., Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Глебова Г. Д., Пекель Н. Д., Березовский В. М. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 9, с. 1161–1170.

Поступила в редакцию
20.VII.1984
После доработки
14.IX.1984

NUCLEOTIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS. XXXVII. SYNTHESIS OF 6-(N-ACETYL-L-CYSTEIN-S-YL)FLAVINMONONUCLEOTIDE

LITVAK J. I., BEREZOVSKII V. M.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

6-(N-Acetyl-L-cystein-S-yl)FMN, the acetyl derivative of the bacterial trimethylaminodehydrogenase natural cofactor, and its analogues, viz. 6-nitro-, 6-amino-, and 6-bromo-riboflavin-5'-phosphate, have been synthesised, and their spectral properties studied.