



УДК 547.475.2'751 : 577.164.2 : 542.51'422.25

© 1991 г.

А. М. Королев, Э. И. Лажко, И. В. Ярцева*,
И. Л. Плихтяк*, Л. Г. Александрова, В. В. Розынов**,
М. Н. Преображенская

ПРЕВРАЩЕНИЯ АСКОРБИГЕНОВ В КИСЛОЙ СРЕДЕ; СТРОЕНИЕ АСКОРБИГЕНА В

ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР, Москва:

*Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва;

**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Превращения аскорбигенов при нагревании при $\text{pH} < 7$ происходят по межмолекулярному механизму, включающему в себя освобождение *L*-аскорбиновой кислоты и присоединение (индол-3-ил) метильного остатка к второй молекуле аскорбигена (Ia) с образованием 1'-[(индол-3"-ил)метил]аскорбигена (IIa), 2'-[(индол-3"-ил)метил]аскорбигена (IIIa) и 2'-[2"-[(индол-3"-ил)метилиндол-3"-ил]метил]аскорбигена (IVa). Те же превращения осуществлены для 5'-бромаскорбигена (Iб). Из 1'-метиласкорбигена и 1'-бутиласкорбигена получены 1'-метил-2'-[(1"-метилиндол-3"-ил)метил]аскорбиген и 1'-бутил-2'-[(1"-бутилиндол-3"-ил)метил]аскорбиген. Показано, что аскорбиген В является смесью соединений (IIa), (IIIa) и (IVa) с преобладанием (IIIa).

В 1936 г. было обнаружено, что в некоторых растениях содержится вещество, которое при нагревании выделяет *L*-аскорбиновую кислоту. Это вещество удалось экстрагировать из капусты органическими растворителями, и ему было дано название «аскорбиген» [1]. Он был синтезирован при конденсации 3-гидроксиметилиндола с *L*-аскорбиновой кислотой, при этом образуется преимущественно аскорбиген А: 2-С-[(индол-3-ил)метил]- α -*L*-трео-*L*-глицеро-3-гексулофуранозо-1,4-лактон, идентичный природному, а в качестве минорного компонента аскорбиген В, которому была приписана структура 2-С-[(индол-3-ил)метил]- α -*L*-трео-*D*-глицеро-3-гексулофуранозо-1,4-лактона [2].

Ранее были получены аналоги аскорбигена [3—5], изучены его превращения в щелочных средах [5, 6], однако механизм высвобождения *L*-аскорбиновой кислоты из аскорбигенов остался неизвестным, поскольку не было ясно, как трансформируется индольная часть молекулы аскорбигена.

Цель настоящей работы — изучение трансформации аскорбигена и его синтетических аналогов в интервале pH 1—7.

В ходе настоящего исследования были разработаны условия ВЭЖХ аскорбигенов (подбор носителя, компонентного состава подвижной фазы, температурные параметры). Этот метод не только позволил идентифицировать полученные соединения в различных реакционных системах и контролировать их чистоту, но и сделал возможным анализ компонентного состава аскорбигенов в различных растениях.

Изучение воздействия разбавленных водных растворов кислот (pH 1,0—3,0) при 37° С на аскорбиген (Ia), 5'-бром-(Iб), 1'-метил-(Iв) и 1'-бутиласкорбиген (Iг) показало, что реакция проходит по межмолекулярному механизму, включающему в себя освобождение *L*-аскорбиновой кислоты и присоединение элиминирующегося (индол-3-ил) метильного остатка к индольной части другой молекулы аскорбигена (см. схему) с образованием 2'-[(индол-3"-ил)метил]аскорбигена (IIIa) и его производных (IIIб—г). Кроме того, при превращениях аскорбигенов (Ia) и (Iб) были выделены соединения (IVa) и (IVб), соответственно содержащие три по-

Выход и физико-химические свойства полученных соединений

Соединение	Выход, %	Эмпирическая формула	[σ] _D ²² (σ , этанол)	(M + H) ⁺	ИК, cm^{-1}	УФ (этанол)		КД (этанол)		ВЭЖХ			R _f	
						λ_{max} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	λ_{max} , нм	$\Delta \epsilon$	У./У.- система	R _T , мин	сплуфол (система А)	спликгаэль (система В)	
														λ_{max} , нм
IIa		$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$	+4,11 (1,0) * +6,41 (1,0)	435	1790	220 280	48,0 15,3	237	+5,0	40 : 60	6,36	0,40	0,35	
IIIa	15	$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$	+4,1 (1,0)	435	1790	220 280	43,0 11,6	237	+4,48	40 : 60	5,16	0,35	0,28	
IIIb	15	$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_6$	+4,4 (0,5)	593	1787	220 280	39,0 7,5	237	+2,27	50 : 50	5,43	0,56	0,48	
IIIв	18	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$	+16,3 (1,0)	462 (M) ⁺	1790	220 280	26,0 5,5	237	+1,56	45 : 55	7,28	0,50	0,50	
IIIr	12	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$	+9,0 (0,4)	546 (M) ⁺	1790	220 280	36,0 8,3	237	+2,0	60 : 40	9,42	0,40	0,40	
IVa	10	$\text{C}_{33}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6$	+1,9 (1,0)	564	1790	220 280	70,0 19	237	+6,24	40 : 60	11,12	0,45	0,40	
IVб	8	$\text{C}_{33}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_6$	+2,2 (0,5)	799	1789	220 280	96,0 22,0	237	+6,3	50 : 50	11,78	0,70	0,77	

* В метаноле.

Данные спектров 1Н-ЯМР аскорбигоенов (δ, м.д., J, Гц)

Соединение	Протоны остатка аскорбиновой кислоты				CH ₂ ' (J _{2em})	CH ₂ " (J _{2em})	CH ₂ ''' (J _{2em})	N-H	Протоны индольных циклов **																						
	H ¹ ₁ H ¹ ₂	H ² ₁ H ² ₂	H ³ ₁ H ³ ₂	H ⁴ ₁ H ⁴ ₂					H ⁵ ₁ H ⁵ ₂	H ⁶ ₁ H ⁶ ₂	H ⁷ ₁ H ⁷ ₂	H ⁸ ₁ H ⁸ ₂	H ⁹ ₁ H ⁹ ₂	H ¹⁰ ₁ H ¹⁰ ₂	H ¹¹ H ¹²	H ¹³ H ¹⁴	J _{4,5}	J _{4,6}	J _{4,7}	J _{5,6}	J _{6,7}	J _{6,8}									
IIa *	3,75	4,15	4,08	3,97	{ 3,19 3,34 (14,7)	5,45				7,20	7,36	7,11-6,90	7,62	7,62	7,2	1,0	7,2	7,2	7,44	7,62	7,62	7,62	7,62	7,2	1,0	4,0	7,2	7,2	0,9	8,1	
	0,7	3,3	9,9	8,4																											
IIIa	4,18	4,92	4,04	4,18	{ 3,34 3,37 (14,8) 3*	4,92				7,17	7,33	6,91	6,94	7,19	7,2	1,0	7,2	7,2	7,44	7,19	7,19	7,19	7,19	7,2	1,0	4,0	7,2	7,2	0,9	8,1	
	0,0	3,3	9,7	5,9																											
IIIb *	4,22	4,33	4,05	4,19	{ 3,40 3,35 (14,9) 4,32 4,32 (16,6) 4,32 (14,8)	4,23				(7,0)	7,76	(6,91)	7,04	7,04	(8,0)	(4,0)	(8,0)	(8,0)	7,04	7,04	7,04	7,04	7,04	(8,0)	(4,0)	1,9	1,9	7,2	7,2	0,9	8,1
	0,0	3,3	9,8	5,9																											
IIIв *	4,29	4,32	4,04	4,18	{ 3,40 3,35 (14,9) 4,32 4,32 (16,6) 4,32 (14,8)	4,73				(6,63)	7,67	7,10-7,30	8,22	8,22	7,8	1,2	8,2	8,2	7,21	7,21	7,21	7,21	7,21	(8,2)	(4,1)	0,8	7,8	8,2	0,9	8,2	
	0,0	3,8	9,3	5,9																											
IIIг	4,25	4,3	4,04	4,18	{ 3,40 3,44 (14,8)	4,32				(6,66)	(7,44)	(6,97)	(7,12)	(7,31)	(7,7)	(4,1)	(8,2)	(8,2)	7,31	7,31	7,31	7,31	7,31	(8,2)	(4,1)	1,0	7,9	8,2	0,9	8,2	
	0,0	3,4	9,8	6,1																											
IVa 4*	4,13	4,28	4,04	4,18	{ 3,40 3,42 (14,6) 4,10 4,22 (14,8)	4,31				7,02	7,33	6,86	7,06	7,31	7,9	1,0	8,2	8,2	7,31	7,31	7,31	7,31	7,31	(8,2)	1,0	1,0	7,9	8,2	0,9	8,2	
	0,0	3,4	9,7	5,8																											
IVб 4*	4,19	4,32	4,05	4,18	{ 3,26 (14,8)	4,24				6,94	7,70	6,84	6,99	6,94	8,1	0,8	8,0	8,0	6,94	6,94	6,94	6,94	6,94	8,0	0,5	0,5	8,1	8,0	1,0	8,4	
	0,0	3,4	9,8	6,1																											
IVв 4*	4,13	4,28	4,04	4,18	{ 3,40 3,42 (14,6) 4,10 4,22 (14,8)	4,31				6,94	7,44	7,19	7,18	7,11	7,9	0,5	8,2	8,2	7,11	7,11	7,11	7,11	7,11	(8,2)	1,9	1,9	7,9	8,2	0,9	8,6	
	0,0	3,4	9,7	5,8																											

* Спектры сняты на спектрометре Bruker WN-360.
 ** Отнесены сигналы протонов каждого из индольных циклов; сигналы, соответствующие индольному кольцу, удаленному от остатка аскорбиновой кислоты, приведены в скобках.
 *** Сигналы протонов перекрываются сигналами растворителя.
 **** Сигналы ароматических протонов не отнесены к определенным индольным циклам.

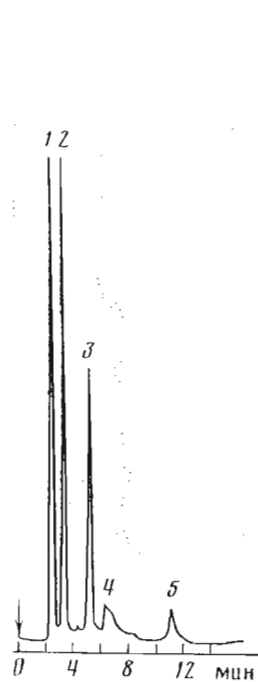


Рис. 1

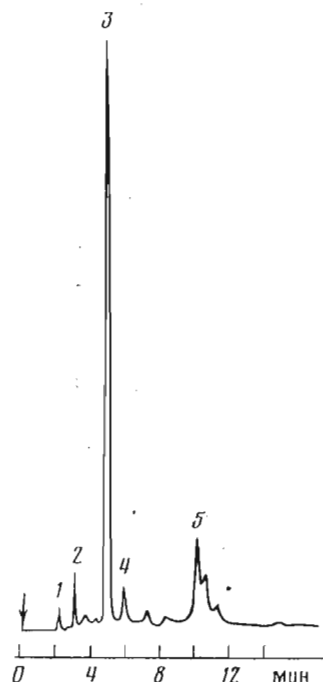


Рис. 2

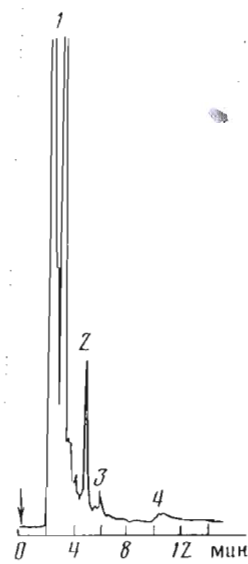


Рис. 3

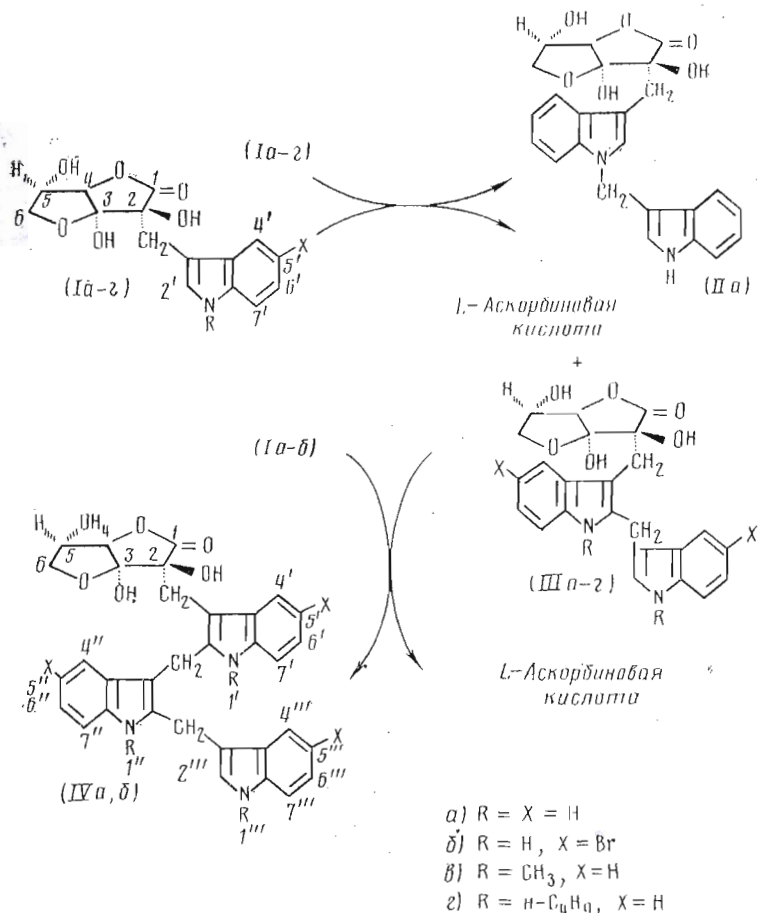
Рис. 1. Хроматограмма кислотного гидролизата аскорбигена А, колонка $4,6 \times 250$ мм, Zorbax ODS, подвижная фаза: 0,1 М ацетат аммония — ацетонитрил (3 : 2), pH 5,7 скорость потока 1 мл/мин. Пики: 1 — аскорбиновая кислота, 2 — (Ia), 3 — (IIIa) 4 — (IIa), 5 — (IVa)

Рис. 2. Хроматограмма аскорбигена В, полученного по методу [2]. Условия хроматографирования и обозначения пиков см. рис. 1

Рис. 3. Хроматограмма этилацетатного экстракта из сока квашеной капусты. Условия хроматографирования и обозначения пиков см. рис. 1. Пики: 1 — (Ia), 2 — (IIIa), 3 — (IIa), 4 — (IVa)

следовательно связанных (индол-3-ил)метильных остатка. Соединения типа (III) и (IV) были выделены из реакционной смеси методом ТСХ. Выходы и константы приведены в табл. 1; с повышением значений pH до 4—7 скорость образования этих соединений и их выходы падают. Трансформация 5'-бромаскорбигена (Iб) проходила только в водно-метанольном растворе (1 : 1) при температуре не ниже 50°C и pH 1,0. При кислотном превращении аскорбигена (Ia) в незначительных количествах также образуется 1'-[(индол-3"-ил)метил]аскорбиген (IIa), наличие которого в реакционной смеси было показано хроматографическими методами. Образец (IIa) был получен как побочный продукт при синтезе аскорбигена (Ia), причем он образуется в заметных количествах, если в реакцию конденсации с *L*-аскорбиновой кислотой вводится 3-гидроксиметилиндол, полученный гидроксиметилированием индола действием формалина в присутствии метилата натрия [3]. Метод ВЭЖХ подтвердил, что при действии кислот на аскорбиген (Ia) образуется аскорбиновая кислота и соединения (IIa), (IIIa) и (IVa) (рис. 1).

В табл. 2 приведены данные ^1H -ЯМР-спектров полученных соединений. Химические сдвиги КССВ протонов углеводной части соединений (II) — (IV) соответствуют значениям, характерным для аскорбигенов (Ia—г) [4]. Протоны метиленовой группы CH_2 , соединенной с остатком аскорбиновой кислоты, образуют АВ-систему. CH_2 -группы, расположенные между индольными циклами, кроме CH_2 -групп в аскорбигене (IIIв) и одной из удаленных метиленовых групп в соединении (IVб), проявляются в виде уширенного синглета. Для стнесения сигналов протонов индольных циклов в соединении (IIIa) использовались данные спектров корреляции химических сдвигов ^{13}C и ^1H через дальние константы спин-спинового взаимодей-



ствия. Отнесение протонов индольных циклов в соединениях (IIIб, г) проведено по аналогии с аскорбигеном (IIIа). Структурное отнесение сигналов ароматических протонов к определенному индольному циклу в соединениях (IVа, б) неоднозначно.

В ИК-спектрах соединений (II)–(IV) наблюдается полоса при 1790 см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы лактонного кольца. УФ-спектры новых соединений и исходных аскорбигенов имеют максимумы поглощения при одних и тех же длинах волн, отличаясь друг от друга значениями экстинкции.

В масс-спектрах с бомбардировкой ускоренными атомами Хе имеются пики протонированных и непротонированных молекулярных ионов (табл. 1). В производных (IIIб), (IVб) пики бромсодержащих фрагментов имеют характерное изотопное распределение.

Сравнение КД-спектров полученных соединений (IIа), (IIIа–д), (IVа, б) подтвердило их одинаковую S-конфигурацию при 2-С-атоме лактонного кольца, хиральность которого главным образом определяет характер этих спектров, имеющих положительный эффект Коттона при 235 нм (сильный) и при 270 нм (слабый), как и исходные аскорбигены (Ia–д) [4]. В соединениях (IIIа, б), (IVа, б) наблюдается усиление интенсивности положительных эффектов Коттона при 235 нм с увеличением числа присоединенных индольных остатков. Таким образом, среди исследованных производных нет эимерных по 2-С-атому лактонного кольца, т. е. с 2-R-конфигурацией.

Наше внимание привлек аскорбиген В, который мы получили описанным методом [2]: для его выделения реакционную смесь после конденсации 3-гидроксиметилиндола и L-аскорбиновой кислоты при pH 4,5 экстрагировали эфиром. Вещества из полученного раствора разделили на стеклянных пластинках, покрытых силикагелем HF₂₅₄, и охарактеризовали

методами ТСХ, ВЭЖХ и ^1H -ЯМР. Оказалось, что аскорбиген В является смесью соединений (IIIa), (IIa) и (IVa) с преобладанием производного (IIIa) (см. рис. 2) и не является 2-С-эпимером аскорбигена А, как считалось до сих пор [2, 7]. Было показано, что при синтезе аскорбигенов (Iв, д) также образуются соединения такого типа (IIIв, д).

Методом ВЭЖХ установлено, что соединения (IIa), (IIIa), (IVa) наряду с (Ia) представляют собой компоненты экстракта, полученного из сока свежей или квашеной капусты (рис. 3), т. е. овощи и фрукты содержат не только аскорбиген А, но и семейство родственных ему соединений. Эти соединения (Ia, IIa, IIIa, IVa) человек и животные получают с пищей в значительных количествах, поэтому представляет интерес изучение их возможной биологической роли.

Экспериментальная часть

Для ТСХ использовали силуфол UV-254, для препаративной хроматографии — пластинки (200 × 200 мм) с толщиной закрепленного слоя силикагеля Merck NF₂₅₄ 0,5 мм. Вещества на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете или проявляли нагреванием пластинок. Использовали системы растворителей: хлороформ — метанол, 7 : 1 (А), 9 : 1 (Б). Свойства полученных соединений представлены в табл. 1. Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на спектрометре NXR-400 Varian или Bruker WH-360 с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектры с бомбардировкой ускоренными атомами Хе получены на масс-спектрометре MS. 50. TC (Kratos, Англия), ИК-спектры (KBr) снимали на спектрометре SP 1100 (Pye Unicam, Англия). УФ-спектры записывали на приборе UV 5260 (Beckman, Австрия) в кварцевых кюветах толщиной 1 см, КД-спектры снимали на дихрографе Jobin Yvon III (Франция) в кварцевых кюветах толщиной 1 см с использованием тех же растворов, что и для УФ-спектроскопии. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (Франция) в кюветах объемом 1 см³ и длиной 10 см. Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе модели 8800 (Du Pont, США) с УФ-детектором SP-8490 (Spectra Physics, США) при 280 нм на колонках Zorbax ODS (4,6 мм × 25 см) с размером частиц 5 мкм при скорости потока 1 мл/мин, температуре 35° С в системах: ацетонитрил (1) — 0,1 М $\text{CH}_3\text{COO-NH}_4^+$ (2) (рН 5,7). Соотношение компонентов подвижной фазы (V_1/V_2) и времена удерживания (R_T) для аскорбигенов приведены в табл. 1. Чистота исходных аскорбигенов (Ia—г) контролировалась методом ВЭЖХ.

I'-[(индол-3"-ил)метил]аскорбиген (IIa), *2'*-[(индол-3"-ил)метил]аскорбиген (IIIa), *2'*-{[2"-[(индол-3"-ил)метил]индол-3"-ил]метил}аскорбиген (IVa). Раствор 0,5 г (1,1 ммоль) аскорбигена (Ia) в 20 мл H_2O подкисляли 1 М HCl до рН 1,0 и нагревали реакционную смесь на водяной бане при 37° С в течение 1 ч до образования белого осадка. Осадок отделяли и растворяли в этилацетате. Надосадочную жидкость экстрагировали также этилацетатом, после чего экстракт и растворенный осадок объединяли, промывали водой, сушили над Na_2SO_4 и растворитель упаривали в вакууме. Остаток растворяли в ацетоне и хроматографировали на стеклянных пластинках с силикагелем, отбирая три полосы (R_f продуктов реакции здесь и далее приведены в табл. 1), с которых вещества элюировали метанолом. Получили аскорбигены (IIa, IIIa, IVa) в виде бесцветных аморфных порошков.

5'-Бром-*2'*-[(5"-броминдол-3"-ил)метил]аскорбиген (IIIб), *5'*-бром-*2'*-{[5"-бром-*2'*-[(5"-броминдол-3"-ил)метил]индол-3"-ил]метил}аскорбиген (IVб). Раствор 0,5 г (1,3 ммоль) 5-бромаскорбигена (Iб) в 20 мл смеси $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ (1 : 1) подкисляли 1 М H_2SO_4 до рН 1,0 и нагревали 8 ч при 50° С. Далее метанол упаривали в вакууме и оставшийся водный раствор обрабатывали как описано выше. Получали (IIIб, IVб) в виде аморфных веществ желтоватого цвета.

I'-Метил-*2'*-[(*I''*-метилиндол-3"-ил)метил]аскорбиген (IIIв). Водный раствор 2,5 г (7,9 ммоль) *N*-метиласкорбигена (Iв) подкисляли 1 М HCl

до рН 1,0 и нагревали 12 ч при 37° С. Образовался осадок ярко-красного цвета. Далее конечный продукт выделяли как описано в предыдущих методиках и получали аморфный бесцветный порошок.

1'-Бутил-2'-[(1''-бутилиндол-3''-ил)метил]аскорбиген (IIIg). Раствор 0,5 г (1,3 ммоль) N-бутиласкорбигена (Iг) в 10 мл смеси метанол — вода (1 : 1) подкисляли 1 М HCl до рН 1,0 и нагревали 12 ч при 37° С, после чего выделяли конечный продукт (IIIг) описанным выше способом в виде аморфного порошка серого цвета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gmelin R., Virtanen A. J. // Ann. Acad. Sci. Fennicae. Ser. A. II. Chemica. 1961. № 107. P. 1—25.
2. Kiss G., Neukom H. // Hely. chim. acta. 1966. V. 49. № 2. P. 989—992.
3. Preobrazhenskaya M. N., Korolev A. M., Plikhtyak I. L., Yartseva I. V., Efimov S. A., Lazhko E. I., Aleksandrova L. G. // Heterocycles in Bio-Organic Chemistry / Eds H. C. van der Plas, J. Bergman, M. Simonyi. RCS, 1991. P. 68—86.
4. Муханов В. И., Ярцева И. В., Кикоть Б. С., Володин В. В., Кустова И. Л., Лесная Н. А., Софьина З. П., Ермакова Н. П., Преображенская М. Н. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 4. С. 544—559.
5. Букин Ю. В., Плихтяк И. Л., Драудин-Крыленко В. А., Ярцева И. В., Орлова Л. М., Преображенская М. Н. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 539—545.
6. Плихтяк И. Л., Ярцева И. В., Клюева Н. А., Преображенская М. Н. // Химия гетероцикл. соедин. 1984. № 5. С. 607—610.
7. The Merck Index / 11th Edition. Merck & Co. Inc. Rahway. N. Y. 1989. № 856. P. 131.

Поступила в редакцию
31.VIII.1990

После доработки
15.I.1991

A. M. KOROLEV, E. I. LAZHKO, I. V. YARTSEVA*, I. L. PLIKHTYAK*,
L. G. ALEKSANDROVA, B. V. ROSYNOV**, M. N. PREOBRAZHENSKAYA

THE TRANSFORMATION OF ASCORBIGENS IN ACIDIC MEDIA: STRUCTURE OF ASCORBIGEN B

Institute of New Antibiotics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;

**All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;*

***M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The transformation of ascorbigens upon heating at pH < 7 proceeds by an intermolecular mechanism involving release of L-ascorbic acid and addition of an (indol-3-yl)methyl moiety to another molecule of ascorbigen (Ia) to yield 1'-[(indol-3''-yl)methyl] ascorbigen (IIa), 2'-[(indol-3''-yl)methyl] ascorbigen (IIIa) and 2'-{[2''-(indol-3'''-yl)methyl]indol-3''-yl}methyl] ascorbigen (IVa). Similar transformations were performed for 5'-bromascorbigen. 1'-Methyl-2'-[(1''-methylindol-3''-yl)methyl]ascorbigen and 1'-butyl-2'-[(1''-butylindol-3''-yl)methyl]ascorbigen were obtained from 1'-methylascorbigen and 1'-butylascorbigen; ascorbigen B is identified as a mixture of (IIa), (IIIa) and (IVa), 2'-[(indol-3''-yl)methyl]ascorbigen (IIIa) being predominant.