



УДК 577.15.013.07

НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

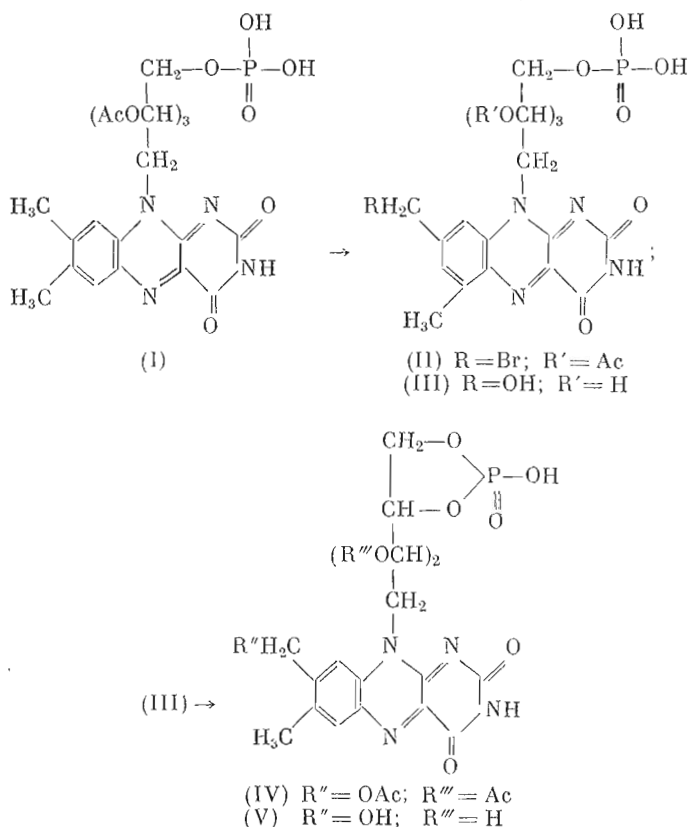
XXXI. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА 8 α -ОКСИФЛАВИНМОНОНУКЛЕотиДА

Жилина Т. А., Березовский В. М.

*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт,
Москва*

Осуществлен синтез 8 α -оксифлавинонуклеотида (III) из 2',3',4'-триацетил-рибофлавина-5'-фосфата (I). Изучены физико-химические свойства полученных соединений.

Есть основания полагать, что флавины с 8 α -функциональной группой либо являются метаболитами, либо принимают участие в биосинтезе 8 α -пептидилфлавинов, входящих в виде простетической группы типа FMN и FAD в некоторые флавопротеиды [1—6]. Ранее уже были синтезированы некоторые 8 α -производные флавинов [1, 7, 8]. Недавно мы получили 8 α -оксирибофлавин и описали его свойства [9]. В настоящей работе мы впервые синтезировали 8 α -оксифлавинонуклеотид (III) и его производные.



В синтезе $\delta\alpha$ -оксипроизводного (III) мы исходили из 2',3',4'-триацетилрибофлавин-5'-фосфата (I), который действием брома в диоксане по методу [2] первоначально был превращен в 2',3',4'-триацетил- $\delta\alpha$ -бромрибофлавин-5'-фосфат (II). Бромирование идет по метильной группе положения 8 соединения (I), а не в другое положение молекулы, так как в ПМР-спектре $\delta\alpha$ -бромпроизводного (II) в CD_3OD по сравнению с ПМР-спектром исходного флавина (I) наблюдается исчезновение трехпротонного сигнала $8-CH_3$ -группы (2,45 м. д.) и появление двухпротонного сигнала $8-CH_2$ -группы (3,65 м. д.), что подтверждается дейтерированием протонов $8-CH_3$ -группы FMN [10].

В тех же условиях идет реакция бромирования 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина до 2',3',4',5'-тетраацетил- $\delta\alpha$ -бромрибофлавина [2]. В электронном спектре поглощения наблюдается значительное уменьшение соотношения величин экстинкции первого и второго максимумов поглощения для $\delta\alpha$ -бромпроизводного (II) ($\epsilon_{446}/\epsilon_{377}$ 0,89) по сравнению с $\delta\alpha$ -незамещенным флавином (I) ($\epsilon_{446}/\epsilon_{374}$ 1,22). Последующий гидролиз бромида (II) привел к динатриевой соли соединения (III).

Замещение атома брома в положении $\delta\alpha$ - на оксигруппу удалось провести при длительном нагревании с раствором $NaHCO_3$ при 65—70° (рН смеси в начале реакции 6,7, а в конце 8,9); при этом одновременно гидролизировались все ацетильные группы. Монофосфат (III) был выделен из динатриевой соли с помощью катионита КУ-2-8 (H^+ -форма). В его спектре поглощения по сравнению со спектром FMN наблюдается характерный для $\delta\alpha$ -замещенных флавинов [1—9] гипсохромный сдвиг полосы поглощения (λ_{max} 375 нм) на 9 нм. Соотношение величин экстинкций $\epsilon_{446}/\epsilon_{365}$ в спектре монофосфата (III) составляет 0,83, тогда как в спектре $\delta\alpha$ -оксирибофлавина $\epsilon_{445}/\epsilon_{363} = 1,28$. Монофосфат (III) в водных растворах характеризуется флуоресценцией с λ_{max} 523 нм, подобной флуоресценции рибофлавина и FMN. Однако по сравнению с FMN наблюдается тушение флуоресценции примерно на 60% в пределах рН 2—9. Ранее уже отмечалось [2, 5, 7], что на флуоресценцию флавинов оказывают влияние заместители в положении $\delta\alpha$.

При действии As_2O_3 в пиридине монофосфат (III) превращается в 2',3'-диацетил- $\delta\alpha$ -ацетооксирибофлавин-4',5'-циклофосфат (IV). Эта реакция аналогична превращению FMN в 2',3'-диацетилрибофлавин-4',5'-циклофосфат в таких же условиях [11].

$\delta\alpha$ -Оксирибофлавин-4',5'-циклофосфат (V) мы получили при взаимодействии монофосфата (III) с N, N-дициклогексилкарбодиимидом в пиридине по методу [12].

Хроматографическая подвижность производных FMN

Соединение	R_f^* в системах			
	А	Б	В	Г
(I)	0,74	0,72	0,43	0,35
(II)	0,74	0,72	0,43	0,35
FMN	0,48	0,49	0,22	0,20
(III)	0,51	0,46	0,21	0,22
2',3'-Диацетилрибофлавин-4',5'-циклофосфат	0,72	0,75	0,45	0,38
(IV)	0,70	0,74	0,46	0,38
Рибофлавин-4',5'-циклофосфат	0,56	0,53	0,25	0,21
(V)	0,51	0,58	0,27	0,25

* В системах А — Г для нисходящей ВХ. Системы растворителей: А — пиридин — изобутанол — вода — уксусная кислота (33:33:33:1) (бумага W 3 MM), Б — трет-бутанол — вода (60:40) (бумага FN 11), В — пиридин — уксусная кислота — вода (4:1:5, верхняя фаза) (бумага FN 11), Г — n-бутанол — этанол — вода (50:15:35) (бумага W 3 MM).

В спектрах поглощения соединений (IV) и (V) также наблюдается характерный для $\delta\alpha$ -замещенных флавинов гипсохромный сдвиг максимума второй полосы (на 5 и 9 нм соответственно) и изменение соотношения экстинкций двух длинноволновых полос поглощения.

В ряду $\delta\alpha$ -оксипроизводных, как и в случае $\delta\alpha$ -незамещенных соединений, образование 4',5'-дифосфата приводит к понижению интенсивности флуоресценции, в то время как ацетилирование 2'-ОН и 3'-ОН повышает ее интенсивность.

Экспериментальная часть

Спектры поглощения в УФ- и видимой области измерены на спектрофотометре Hitachi-EP-3T в фосфатном буфере (рН 7). Спектры ПМР снимали на приборе Perkin-Elmer R-20A при 60 МГц в CD_3OD (внутренний стандарт — тетраметилсилан) и в D_2O (внутренний стандарт — натриевая соль 2,2-диметил-2-силапента-5-сульфокислоты, рН 6,92), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре Hitachi MPF-2A в фосфатном буфере (рН 7), ИК-спектры — на инфракрасном спектрофотометре Perkin-Elmer-180 в вазелиновом масле. Для изучения зависимости флуоресценции от рН использовали следующие растворы: глицин — 0,2 М HCl (рН 1,4—3,6), 0,2 М CH_3COONa — 0,2 М CH_3COOH (рН 4—5,6), 0,1 М Na_2HPO_4 — 0,1 М NaH_2PO_4 (рН 6—8), 1 М $NaHCO_3$ — 1 М Na_2CO_3 (рН 8—10). Температуры плавления веществ определяли на приборе Yano MP-3D (Япония). Потенциометрическое титрование проводили на приборе ЛПУ-01.

2',3',4'-Триацетилрибофлавин-5'-фосфат (I) получили из FMN по методике [13] в виде перхлората с выходом 94%. Для перхлората т. пл. 184,5—187°. Спектр поглощения, $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-4}$): 224(2,65), 268(2,80), 374(0,89), 446(1,09); $\epsilon_{268}/\epsilon_{224}$ 1,06; $\epsilon_{446}/\epsilon_{374}$ 1,22. ПМР, δ_{CD_3OD} , м. д.: 8,01 (6-СН), 7,75 (9-СН), 2,60(7-СН₃), 2,45(8-СН₃), 1,70; 2,02; 2,22 (Ас-группы). Флуоресценция, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$ 523 нм ($I_{\text{отн}}^{\%}$ 117).

Найдено, %: С 39,91; Н 3,99; N 8,46; Р 4,02; Cl 4,78. $C_{23}H_{27}N_4O_{12}P \cdot HClO_4$. Вычислено, %: С 40,45; Н 4,13; N 8,20; Р 4,53; Cl 5,19.

2',3',4'-Триацетил- $\delta\alpha$ -бромрибофлавин-5'-фосфат (II). 0,4 г соединения (I) нагревали в 40 мл сухого диоксана до кипения, прибавляли при интенсивном перемешивании 0,008 г перекиси бензоила и раствор 0,056 мл брома в 6 мл четыреххлористого углерода в течение 5 мин, кипятили 40 мин. Горячую реакционную смесь фильтровали, фильтрат выдерживали в холодильнике 0,5 ч, снова фильтровали и упаривали под вакуумом (30—40°) до маслообразного остатка, который растирали с сухим эфиром в осадок желтого цвета, сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход 0,35 г (77%) с т. пл. 171,2—173,4°. Спектр поглощения, $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-4}$): 224(2,48), 268(2,58), 377(1,04), 446(0,93); $\epsilon_{268}/\epsilon_{224}$ 1,04; $\epsilon_{446}/\epsilon_{377}$ 0,89. ПМР, δ_{CD_3OD} , м. д.: 8,15(6-СН), 7,92(9-СН), 2,62(7-СН₃), 3,65(8-СН₂), 1,70; 2,05; 2,22(Ас-группы). Флуоресценция, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$ 524 нм ($I_{\text{отн}}^{\%}$ 69).

Найдено, %: С 41,24; Н 4,70; N 8,26; Br 12,02; Р 4,98. $C_{23}H_{26}N_4O_{12}PBr$. Вычислено, %: С 41,76; Н 4,01; N 8,47; Br 12,08; Р 4,68.

$\delta\alpha$ -Оксифлавиноконуклеотид (III). Раствор 3 г соединения (II) в 1100 мл воды нейтрализовали 3% водным раствором $NaHCO_3$ (90 мл) до рН 6,7 и нагревали 23 ч при 65—70°; в конце реакции рН составило 8,8—8,9. Раствор упаривали при пониженном давлении (30—40°) до объема 180 мл, добавляли 180 мл метанола, фильтровали, фильтрат упаривали до объема 45 мл, добавляли 150 мл метанола и отфильтровывали 0,6 г динатриевой соли соединения (III). Фильтрат снова упаривали до объема

* Здесь и далее величина $I_{\text{отн}}^{\%}$ дана в % по отношению к интенсивности флуоресценции FMN; спектры не корректированы. Длина волны возбуждения 445 нм.

30 мл, прибавляли 110 мл 96% этанола, отфильтровывали еще 1,2 г динатриевой соли соединения (III) (содержание 60%). Обе порции переосаждали из воды добавлением 96% этанола, растворяли в 150 мл воды и обрабатывали катионитом КУ-2-8 (H⁺-форма) до получения раствора с pH 2,5. Отфильтровывали катионит, фильтрат упаривали под вакуумом до маслянистого остатка, промывали 10 мл этанола, сушили азеотропно с абсолютным этанолом. Остаток промывали дважды по 10 мл этанола. После сушки в вакууме над P₂O₅ получили 0,73 г (34%) соединения (III); вещество разлагается до 190°. Спектр поглощения, λ_{макс}, нм (ε·10⁻⁴): 223 (2,20), 268(1,65), 365(0,65), 446 (0,54); ε₂₆₈/ε₂₂₃ 0,75; ε₄₄₆/ε₃₆₅ 0,83; (в 6 н. HCl): 220 (1,88), 265(1,90), 396(0,90). Флуоресценция, λ_{макс}^{фл} 523 нм (I_{отн} 46); pK_{a1} 4,5; pK_{a2} 8,4.

Найдено, %: C 43,50; H 4,48; N 11,48; P 6,10; C₁₇H₂₁N₄O₁₀P. Вычислено, %: C 43,22; H 4,48; N 11,86; P 6,55.

2',3'-Диацетил-8α-ацетоксирибофлавин-4',5'-циклофосфат (IV). 0,26 г соединения (III) в 200 мл безводного пиридина нагревали до 50°, прибавляли 9 мл As₂O и выдерживали при интенсивном перемешивании 2 ч при 50°, 10 ч при 70° и 1 ч при 20—25°. Раствор упаривали под вакуумом (40—50°) до остатка, затем упаривали дважды с 10 мл воды, сушили азеотропно с абсолютным этанолом, растворяли остаток в 5 мл этанола и высаживали добавлением 40 мл сухого эфира темно-желтый осадок. Сушили в вакууме 1 мм/20°. Получили 0,27 г (82%) соединения (IV) с т. пл. 167,5—170,8°. Спектр поглощения, λ_{макс}, нм (ε·10⁻⁴): 223 (2,20), 268(1,68), 369 (0,53), 446(0,46); ε₂₆₈/ε₂₂₃ 0,76; ε₄₄₆/ε₃₆₉ 0,87. ПМР, δ^{D₂O}, м. д.: 8,01 (9-CH), 7,95 (6-CH), 5,62 (8-CH₂), 2,35(7-CH₃), 2,28; 2,21; 1,79 (Ac-группы). ИК, ν_{макс}, см⁻¹: 1750, 1680 (C₍₄₎=O, C₍₂₎=O), 1580, 1550 (C=C, C=N), 1090 (—C—O—CH₂—). Флуоресценция, λ_{макс}^{фл} 524 нм (I_{отн} 47); pK_a 6,7. Найдено, %: C 48,00; H 4,75; N 9,41; P 5,57. C₂₃H₂₅N₄O₁₂P. Вычислено, %: C 47,60; H 4,54; N 9,60; P 5,33.

8α-Оксирибофлавин-4',5'-циклофосфат (V). 0,04 г соединения (III) растворяли в 0,4 мл воды, добавляли 20 мл пиридина и 0,8 г N, N-дициклогексилкарбодиимида в 10 мл пиридина, встряхивали 30 ч при 18—22°. Добавляли 10 мл воды, перемешивали 1 ч, упаривали под вакуумом (50°) досуха, добавляли 50 мл воды, выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали. Фильтрат экстрагировали эфиром (3 × 20 мл). Водный раствор упаривали под вакуумом (40°), остаток сушили азеотропно с этанолом, растирали с сухим эфиром в оранжевый осадок, сушили в вакууме над P₂O₅. Получили 0,02 г (52%) соединения (V); вещество разлагается до 190°. Спектр поглощения, λ_{макс}, нм: 223, 268, 365, 446; D₂₆₈/D₂₂₃ 0,79; D₄₄₆/D₃₆₅ 0,92. Флуоресценция, λ_{макс}^{фл} 523 нм (I_{отн} 32), pK_a 6,1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salach J., Walker W. H., Singer T. P., Ehrenberg A., Hemmerich P., Ghisla S., Hartmann U. (1972) Eur. J. Biochem., **26**, 267—278.
2. Walker W. H., Singer T. P., Ghisla S., Hemmerich P. (1972) Eur. J. Biochem., **26**, 279—289.
3. Kenney W. C., Edmondson D. E., Singer T. P. (1974) FEBS Lett., **41**, 111—114.
4. Kenney W. C., Edmondson D. E., Singer T. P. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **57**, 106—111.
5. Kearney E. B., Salach J., Walker W. H., Seng R., Singer T. P. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **42**, 490—496.
6. Hendricks R., Cronin J. R. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **44**, 313—319.
7. Kenney W. C., Walker W. H. (1972) FEBS Lett., **20**, 297—301.
8. Тульчинская Л. С., Жилина Т. А., Степанов А. И., Березовский В. М. (1975) Ж. обл. химии, **45**, 928—932.
9. Жилина Т. А., Шейман В. М., Мельникова Л. М., Березовский В. М. (1976) Биооргав. химия, **2**, 1103—1106.

10. Bullock F. J., Jardetzky O. (1965) *J. Org. Chem.*, **30**, 2056—2057.
11. McCormick D. B. (1974) *J. Heterocycl. Chem.*, **11**, 969—974.
12. Tanaka T., яп. пат. 9973 (1958); *C. A.*, **54**, 5714 (1960).
13. Christie S. M. N., Kenner G. W., Todd A. R. (1954) *J. Chem. Soc.*, **46**, 46—52.

Поступила в редакцию
14.IX.1976

**NUCLEOTIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS.
XXXI. SYNTHESIS AND PROPERTIES OF 8 α -HYDROXY-FMN**

ZHILINA T. A., BEREZOVSKII V. M.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

2', 3', 4'-Triacetyl-8 α -bromoriboflavin-5'-phosphate and 8 α -hydroxy-FMN have been synthesized. The compounds obtained were characterized by chromatography data, as well as by absorption, fluorescence and PMR-spectra. Besides, pK_a values were determined.
