



УДК 577.164.12 + 541.69

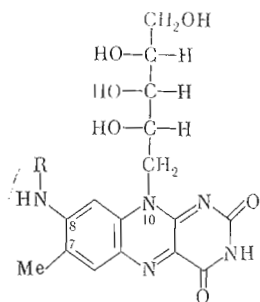
ИССЛЕДОВАНИЕ В РЯДУ АЛЛО- И ИЗОАЛЛОКСАЗИНА<sub>2</sub>[XLVI. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ  
АМИНОАНАЛОГОВ РИБОФЛАВИНА*Березовский В. М., Степанов А. И., Полякова Н. А.,  
Тулчинская Л. С., Кукуанова А. Я.**Всероссийский научно-исследовательский витаминный институт,  
Москва*

Конденсацией замещенных *m*-фенилендиаминов с виолуровой кислотой синтезированы новые аминоканалоги рибофлафина — 8-диметиламино(7,8-динор)рибофлафин, 8-диметиламино(нор)-2'-дезоксирибофлафин, 8-диметиламино(7,8-динор)-2'-дезоксирибофлафин и 8-метиламино(нор)рибофлафин. Выявлено ингибирующее влияние аминоканалогов рибофлафина на синтез 6,7-диметил-8-*D*-рибифилломазина и рибофлавинсинтетазу у штаммов *Bacillus subtilis* с различным генетическим состоянием рибофлавинового оперона. Аминоканалоги вызывают конкурентное по отношению к рибофлафину подавление роста некоторых штаммов этой культуры. Наибольшей антиметаболической активностью обладает 8-диметиламино(нор)рибофлафин, причем биологическая специфичность этого аналога в отношении синтеза рибофлафина подтверждается выделением мутантов *B. subtilis*, устойчивых к аналогу и обладающих сверхсинтезом рибофлафина.

Замена метильной группы в положении 8 молекулы рибофлафина на аминоканальную резко меняет физико-химические и биологические свойства молекулы. Синтезированные нами ранее аналоги рибофлафина с первичной и вторичной аминоканальными группами — 8-амино(нор)рибофлафин (I) и 8-*D*-рибифиламино(нор)рибофлафин (II) [1] — оказались наиболее сильными из известных конкурентных ингибиторов витамина В<sub>2</sub> для зависимого по рибофлафину штамма *Lactobacillus casei* [2]. Позднее в природных источниках был обнаружен и выделен из штамма *Streptomyces davawensis* 768 аминоканалог рибофлафина с третичной аминоканальной группой [3] — 8-диметил-амино(нор)рибофлафин (розеофлафин) (III) [4, 5]. Это соединение проявило антимикробную активность против грамположительных бактерий [4].

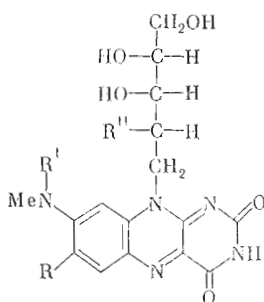
В настоящей работе мы синтезировали новые аминоканалоги рибофлафина (IV) — (VII), воспроизвели синтез розеофлафина (III) по [5] и выявили различия в биологических свойствах синтезированных соединений, а также полученных ранее соединений (I) и (II) [1].

Исходными соединениями в синтезе аминоканалогов рибофлафина служили производные *m*-фенилендиамина (VIII) — (X), которые были превращены в соответствующую *N*-гликозиды (XI) — (XIV) конденсацией с *D*-рибозой или 2-деокси-*D*-рибозой. Каталитическое гидрирование *N*-гликозидов в присутствии никеля Ренея привело к *N*-рибифильным производным (XV) — (XVIII). Вторичный амин (XIX) был получен гидролизом тозилного производного (XVIII). Диамины (XV) — (XVII) и



(I): R = H

(II): R = CH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH



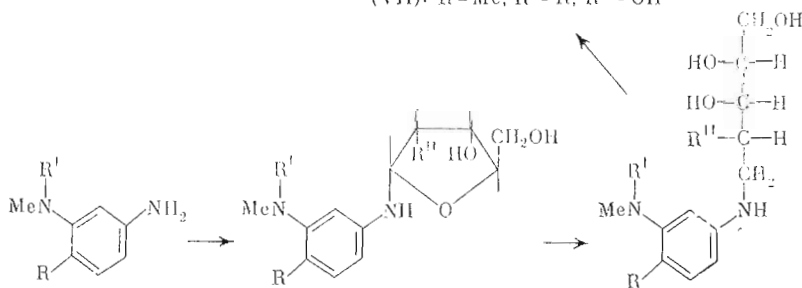
(III): R = R' = Me, R'' = OH

(IV): R = H, R' = Me, R'' = OH

(V): R = R' = Me, R'' = H

(VI): R = R'' = H, R' = Me

(VII): R = Me, R' = H, R'' = OH



(VIII): R = H, R' = Me

(IX): R = R' = Me

(X): R = Me, R' = Tos

(XI): R = H, R' = Me, R'' = OH

(XII): R = R' = Me, R'' = H

(XIII): R = R' = H, R'' = Me

(XIV): R = Me, R' = Tos, R'' = OH

(XV): R = H, R' = Me, R'' = OH

(XVI): R = R' = Me, R'' = H

(XVII): R = R' = H, R'' = Me

(XVIII): R = Me, R' = Tos, R'' = OH

(XIX): R = Me, R' = H, R'' = OH

(XIX) были превращены в изоаллоксазины (IV) — (VII) путем конденсации с виолуровой кислотой.

Электронные спектры поглощения синтезированных аминоканалогов рибофлавина (IV) — (VII) в воде характеризуются полосами поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  255—259, 306—320 и 493—507 нм и подобны спектрам известных соединений (I) — (III), что подтверждает их строение как изоаллоксазинов (табл. 1). Характерно, что из-за наличия в молекуле вторичной или

Таблица 1

Ультрафиолетовый и видимый спектр поглощения аминоканалогов рибофлавина

Соединение	В метиловом спирте						В воде					
	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$
(I)	254	5,00	285—302	0,72	478	4,92 *	254	4,66	285—302пл.	0,91†	478	4,05
(II)	256	4,35	306	0,85	485	3,75 *	255	4,65	306	1,18	478	3,69
(III)	258	3,86	310пл.	0,72	493	3,41	259	3,96	315	0,77	506	3,18
(IV)	259	4,94	317	0,93	497	4,08	258	4,43	320	1,21	507	3,67
(V)	260	4,49	300—310пл.	0,67	493	3,92	258	4,42	315	0,84	500	3,55
(VI)	258	4,92	316	0,79	496	4,06	257	4,19	320	1,15	505	3,39
(VII)	255	3,98	288—310	0,89	488	2,83 *	255	4,56	306	0,11	493	2,88 *

\* Спектр снят в 4% растворе DMSO в MeOH.

третьичной ауксохромной аминогруппы длинноволновая полоса претерпевает bathochromный сдвиг на 33—48 и 55—62 нм соответственно по сравнению с рибофлавином ( $\lambda_{\text{макс}}$  445 нм) с резким увеличением интенсивности поглощения. В спектрах наблюдаются также характерные различия в bathochromном смещении длинноволновой полосы поглощения, вызываемые введением в аминогруппу изоаллоксазина одного или двух алкильных заместителей [ср. спектры в воде соединений (I), (II) и (VII) и соединений (III) — (VI)].

Электронные спектры поглощения диметиламиноаналогов (III) — (VI) в метиловом спирте характеризуются подобными же полосами поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  258—260, 300—317 (плечо или максимум) и 493—497 нм. Длинноволновая полоса этих соединений в метиловом спирте смещена на 7—13 нм в сторону коротких волн по сравнению со спектром в воде; этого явления не наблюдается для рибофлавина.

Первичный и вторичные аминоаналоги в метиловом спирте проявляют интенсивную флуоресценцию: желто-зеленую с  $\lambda_{\text{макс}}$  518 нм (I), зелено-желтую с  $\lambda_{\text{макс}}$  525 и 522 (II) и (VII). Третичные аминоаналоги (III) — (VI) практически лишены флуоресценции в противоположность рибофлавиону с его характерной интенсивной желто-зеленой флуоресценцией. В отличие от изоаллоксазинов (III) — (VII) диметиламиногруппа не тушит флуоресценции аллоксазинов, например, в случае 7-метил-8-диметиламиноаллоксазина.

Биологическая активность 8-аминоаналогов рибофлавина (I) — (VII) изучена по отношению к нескольким штаммам *Bacillus subtilis* с различным уровнем синтеза витамина В<sub>2</sub>, что позволило оценить биологическую специфичность и активность аналогов на фоне различного генетического состояния рибофлавинового оперона. Ранее нами было установлено [6], что 8-амино(нор)рибофлавин (I) и 8-D-рибитиламино(нор)рибофлавин (II) проявляют высокую ингибирующую активность (в концентрации 6—12 мкг/мл), вызывая конкурентное с рибофлавином подавление роста штамма *B. subtilis* Rib B110, причем рибофлавин специфически снимал ингибирующий эффект аналогов (I) и (II). В относительно низких концентрациях (~0,3—0,7 мкг/мл) аналоги (I) и (II) подавляют синтез 6,7-диметил-8-D-рибитиламиомазина (ДРЛ), а следовательно, и рибофлавина у ауксотрофного мутанта Rib B110 с неповрежденной системой регуляции активности рибофлавинового оперона и в пределах изученных концентраций (до 1000 мкг/мл) не подавляют рост прототрофного штамма и регуляторного мутанта Rib C (RF1). Так же ведет себя и 8-метиламино(нор)рибофлавин (VII).

8-Диметиламино(нор)рибофлавин (III) в концентрации 0,05 мкг/мл подавляет синтез ДРЛ, непосредственного предшественника биосинтеза рибофлавина, у ауксотрофа Rib B 110, а также подавляет рост прототрофного штамма *B. subtilis* в концентрации 50 мкг/мл (рис. 1) и мутанта Rib B 110 в очень низкой концентрации — 0,5 мкг/мл, причем 1 мкг/мл рибофлавина специфически снимает ингибирующее действие аналога. 8-Диметиламино (7,8-динор)рибофлавин (IV), у которого по сравнению с рибофлавином и соединением (III) удалена 7-СН<sub>3</sub>-группа, имеет значительно меньшую антиметаболическую активность: подавление роста прототрофного штамма и ауксотрофа Rib B110 происходит только в концентрации 500 и 6 мкг/мл соответственно, а подавление синтеза ДРЛ — в концентрации 0,5 мкг/мл. По ингибирующей активности диметиламиноаналог (IV) становится равнозначным первичному (I) и вторичному (II) аминоаналогам. Следовательно, замещение 8-СН<sub>3</sub>-группы рибофлавина на первичную, вторичную или третичную аминогруппы [соединения (I) — (IV)] приводит к образованию биологически активных специфических антиметаболитов, сохраняющих способность подавлять биосинтез рибофлавина у *B. subtilis*.

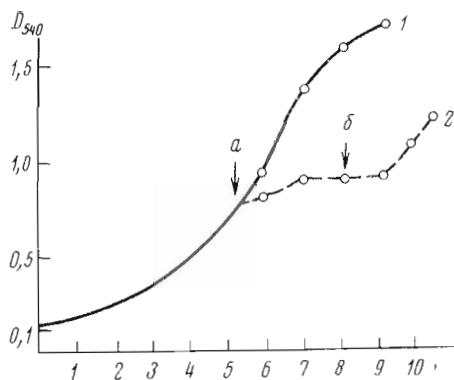


Рис. 1. Подавление роста прототрофного штамма *Bacillus subtilis* 8-диметиламино(нор)рибофлавином (III). 1 — контроль без аминоканалога, 2 — после прибавления: а — 200 мкг/мл аминоканалога, б — 1 мкг/мл рибофлавина

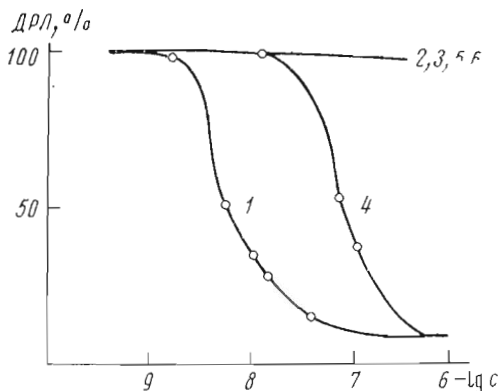


Рис. 2. Зависимость накопления 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина (ДРЛ) от концентрации аналогов (М) 8-диметиламино(нор)рибофлавина (III) для штаммов Rib B110 (1), Rib B110-C (2), Rib B110-0 (3) и 8-амино(нор)рибофлавина (I) для штаммов Rib B110 (4), Rib B110-C (5), Rib B110-0 (6)

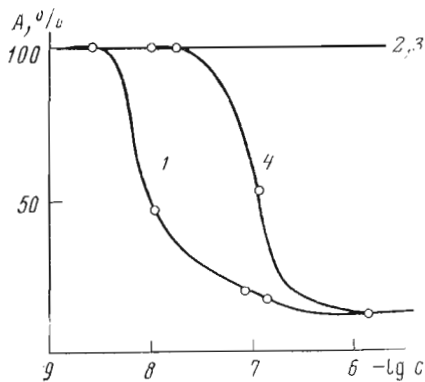


Рис. 3. Зависимость удельной активности рибофлавинсинтетазы от концентрации аналогов (М) 8-диметиламино(нор)рибофлавина (III) для штаммов Rib D 107 (1), Rib D107-C (2), Rib D107-O (3) и 8-амино(нор)рибофлавина (I) для штамма Rib D107 (4)

8-Диметиламино(нор)-2'-дезоксирибофлавин (V), аналог с рибитильной цепью, лишенной одной гидроксильной группы по сравнению с рибофлавином и соединением (III), теряет регулирующие свойства в отношении синтеза рибофлавина и в концентрациях до 200 мкг/мл уже не оказывает влияния на рост штаммов *B. subtilis*. Подобно ведет себя и соединение (VI). Эти данные свидетельствуют о важной роли рибитильной цепи в регулирующей функции витамина B<sub>2</sub>.

Для исследования природы угнетения аминоканалогами рибофлавина роста бактерий были определены изменения регуляторных характеристик штаммов *B. subtilis* под влиянием аналогов (I) и (III). Для этого определена зависимость накопления ДРЛ в культуральной жидкости мутанта Rib B110 (рис. 2) и зависимость удельной активности рибофлавинсинтетазы мутанта Rib D107 (рис. 3) от концентрации аминоканалогов рибофлавина (I) и (III) (см. рис. 2). Подавление синтеза ДРЛ и рибофлавинсинтетазы 8-диметиламино(нор)рибофлавином (III) осуществляется в концентрациях почти на два порядка меньше, чем в случае 8-амино(нор)рибофлавина (I) и рибофлавина, кривые регуляции которых практически совпадают. Таким образом, среди синтезированных и исследованных биологически активных аминоканалогов рибофлавина, специфических антиметаболитов, 8-диметиламино(нор)рибофлавин (III) оказался значительно более активным эффектором в регуляции рибофлавинового оперона даже по

сравнению с рибофлавином; он обладает большим сродством к белку-регулятору.

Биологическая специфичность 8-диметиламино(нор)рибофлавина (III) в отношении синтеза рибофлавина выявилась также в том, что были выделены мутанты *B. subtilis*, устойчивые к этому аналогу. Большинство из полученных мутантов, устойчивых к 100 мкг/мл 8-диметиламино(нор)рибофлавина, обладали сверхсинтезом рибофлавина и приобрели способность выделять его в среду в концентрации до 10 мкг/мл. Полученные данные говорят о возможности специфического применения аминоканалога (III) для генетических и селекционных исследований.

### Экспериментальная часть

Спектры поглощения в УФ- и видимой области записаны на спектрофотометре Hitachi-EP-3T (Япония). Спектры ПМР снимались на приборе Hitachi — Perkin-Elmer R-20A (Япония) при 60 МГц в  $\text{CF}_3\text{COOH}$  с внутренним стандартом тетраметилсиланом, значения  $\delta$  приведены в м. д.,  $J$  — в Гц (с — синглет, д — дублет, м — мультиплет). Температуры плавления определены на приборе Yanaco MP-3D (Япония). Температуры плавления и элементные анализы полученных веществ представлены в табл. 2. БХ аналогов рибофлавина (IV) — (VII) проводили в восходящем потоке на бумаге марки FN-11 в системах растворителей: 1) пиридин — изобутанол — вода — уксусная кислота (33 : 33 : 33 : 1), 2) *n*-бутанол — вода — уксусная кислота (6 : 2 : 2), 3) *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3).

2-(*N*-Метил-*n*-толилсульфамидо)-4-толуидин (X). 17 г 5-нитро-1,2-толуидина и 20 г *n*-толуолсульфохлорида в 40 мл сухого пиридина нагревали 5 ч при 100°. Затем раствор выливали в 700 мл ледяной воды, при этом тозилльное производное выделялось в виде маслообразного продукта, который растирали с водой; полученные кристаллы отфильтровывали и промывали на фильтре водой. Выход 20,5 г (59,7%) 2-(*n*-толилсульфамидо)-4-нитротолуола.

15,8 г этого соединения смешивали со 150 мл 1 н. раствора едкого кали и при 50—60° порциями при размешивании в течение 4 ч прибавляли

Таблица 2

Температура плавления и элементный анализ синтезированных соединений

Соединение	Т. пл., °С	Найдено, %			Брутто-формула	Вычислено, %		
		С	Н	N		С	Н	N
(IV)	273	50,97	5,56	17,61	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_6$	52,16	5,41	17,89
(V)	294	55,51	5,95	17,99	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$	54,70	5,89	18,00
(VI)	>300	54,07	5,77	18,21	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$	54,39	5,65	18,66
(VII)	>300	52,33	5,37	17,42	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_6$	52,17	5,40	17,89
(X)	109	62,70	6,28	9,47	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	62,00	6,25	9,61
(XI)	116	58,23	7,34	10,66	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$	58,20	7,51	10,44
(XII)	102—103	63,04	8,18	10,50	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$	63,13	8,33	10,52
(XIII)	148	61,31	7,90	10,33	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$	61,80	7,99	11,11
(XIV)	112	57,20	6,10	6,56	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$	56,86	6,20	6,63
(XV)	129—130	57,43	7,77	10,17	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$	57,76	8,20	10,36
(XVI)	101	62,50	8,96	10,75	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$	62,65	9,01	10,44
(XVII)	143—144	61,88	8,00	10,58	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$	61,39	8,72	11,01
(XVIII)	Масло	55,73	6,74	6,71	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$	56,58	6,65	6,61
*	160	54,89	4,60	9,50	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	54,89	4,61	9,15
**	114—115	55,97	5,06	8,75	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	56,26	5,00	8,74

\* 2-(*n*-Толлилсульфамидо)-4-нитротолуол.

\*\* 2-(*N*-Метил-*n*-толилсульфамидо)-4-нитротолуол.

100 мл диметилсульфата; щелочную реакцию среды поддерживали добавлением 1 н. раствора едкого кали (~ 500 мл). Выделившийся при реакции маслообразный продукт постепенно кристаллизуется. Его отделяли на фильтре от раствора и промывали водой. Выход 7,5 г (45,4%) 2-(*N*-метил-*n*-толилсульфамидо)-4-нитротолуола. 5 г последнего соединения в 70 мл метилового спирта гидрировали в автоклаве при 40 атм над скелетным никелевым катализатором (5 г) 6 ч при 60°. Катализатор отфильтровывали, промывали метиловым спиртом. Раствор упаривали в вакууме. Выход соединения (X) 4,1 г (91,1%). Для анализа вещество перекристаллизовывали из спирта.

*3*-Диметиламиноанилин-*N*-*D*-рибозид (XI). Раствор 1,18 г 3-диметиламиноанилина (VIII) и 1,3 г *D*-рибозы в 30 мл метанола кипятили 3 ч, упаривали в вакууме до 10 мл и оставляли в холодильнике. Выпавший осадок отфильтровывали; выход соединения (XI) 1,35 г (58,1%). Для анализа вещество перекристаллизовывали из спирта.

*3*-Диметиламино-4-толуидин-*N*-*D*-2'-дезоксирибозид (XII) и *3*-диметиламиноанилин-*N*-*D*-2'-дезоксирибозид (XIII). Раствор 2 г 3-диметиламино-4-толуидина (IX) или 3-диметиламиноанилина (VIII) и 2 г 2'-деокси-*D*-рибозы в 15 мл метилового спирта перемешивали 3 ч при 10—15°. Выпавший при стоянии осадок отфильтровывали. Выход соединения (XII) 3,15 г (90,4%), а соединения (XIII) — 2,51 г (67,8%). Для анализа вещество перекристаллизовывали из метилового спирта.

*3*-(*N*-Метил-*n*-толилсульфамидо)-4-толуидин-*N*-*D*-рибозид (XIV). Раствор 3,5 г соединения (X) и 1,57 г *D*-рибозы в 30 мл метилового спирта нагревали 3 ч при кипении, затем упаривали в вакууме. Остаток растирали с эфиром и осадок отфильтровывали. Получили 3,1 г (70,0%) соединения (XIV).

*3*-Диметиламинофенил-*D*-рибитиламин (XV). Раствор 1 г рибозида (XI) в 70 мл метилового спирта гидрировали в присутствии никелевого катализатора в автоклаве при 70 атм и 60° в течение 1 ч, затем 2 ч при 70° и 1 ч при 80°. Катализатор отфильтровывали, промывали 100 мл горячего спирта, раствор упаривали в вакууме до 20 мл и по охлаждению отделяли осадок. Выход соединения (XV) 0,65 г (65,5%). Для анализа вещество перекристаллизовывали из спирта.

*3*-Диметиламино-4-толил-(XVI) и *3*-диметиламинофенил-*D*-2'-дезоксирибитиламин (XVII). Раствор 2 г 2'-дезоксирибозида (XII) или (XIII) в 70 мл метилового спирта гидрировали в автоклаве над скелетным никелевым катализатором (3 г) 4 ч при 40 атм и 40—45°. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали в вакууме до 25 мл и по охлаждению отделяли осадок. Выход соединения (XVI) 1,32 г (65,6%), а соединения (XVII) — 1,5 г (74,4%). Для анализа вещество перекристаллизовывали из спирта.

*3*-(*N*-Метил-*n*-толилсульфамидо)-4-толил-*D*-рибитиламин (XVIII) и *3*-метиламино-4-толил-*D*-рибитиламин (XIX). 3,5 г соединения (XIV) в 70 мл метилового спирта гидрировали аналогично рибозиду (XI). Получали 2,5 г (71,4%) соединения (XVIII) в виде маслообразного продукта. Раствор 1 г соединения (XVIII) в смеси 1,2 мл конц. серной кислоты и 0,5 мл уксусной кислоты нагревали в течение 1 ч при 100°, реакционную смесь выливали на 15 г льда, затем нейтрализовали 1 н. раствором едкого натра до pH 6,5. Получали водный раствор соединения (XIX), который непосредственно использовали для дальнейшего синтеза.

*7*-Метил-8-диметиламино-10-(1'-*D*-рибитил)изоаллоксазин (III) синтезирован по методу [5]. ПМР:  $\delta$  7,90 (1H, с, 6-H), 7,35 (1H, с, 9-H), 3,60 (6H, с, -NMe<sub>2</sub>), 2,75 (3H, с, 7-CH<sub>3</sub>).

*8*-Диметиламино-10-(1'-*D*-рибитил)изоаллоксазин (IV). 2,7 г соединения (XV) и 1,73 г виолуровой кислоты в 30 мл 50% метилового спирта нагревали 3 ч при кипении. По охлаждению осадок соединения (IV) отфильтровывали, промывали 10 мл метилового спирта. Выход 2,04 г (52,3%). Вещество перекристаллизовывали из 50% спирта.  $R_f$  0,50 (система 1),

0,11 (система 2), 0,28 (система 3). ПМР:  $\delta$  8,02 (1H, д,  $J$  9 Гц, 6-H или 7-II), 7,68 (1H, д,  $J$  9 Гц, 6-H или 7-H), 7, 10 (1H, с, 9-H), 3,72 (6H, с, -NMe<sub>2</sub>).

7-Метил-8-диметиламино-10-[1'-D-(2'-дезоксирибитил)изоаллоксазин (V) получили из соединения (XVI) и виолуровой кислоты аналогично соединению (IV). Выход 1,63 г (41,8%). Вещество перекристаллизовывали из 50% спирта.  $R_f$  0,67 (система 1), 0,28 (система 2), 0,44 (система 3). ПМР:  $\delta$  7,86 (1H, с, 6-H), 7,15 (1H, с, 9-H), 3,74 (6H, с, -NMe<sub>2</sub>), 2,75 (3H, с, 7-CH<sub>3</sub>).

8-Диметиламино-10-[1'-D-(2'-дезоксирибитил)изоаллоксазин (VI) получали из соединения (XVII) и виолуровой кислоты аналогично соединению (IV). Выход 2,35 г (59,2%). Вещество перекристаллизовывали из 50% спирта.  $R_f$  0,57 (система 1), 0,18 (система 2), 0,33 (система 3). ПМР:  $\delta$  7,42—8,22 (м, 6-H, 7-H), 7,05 (1H, с, 9-H), 3,55 (6H с, -NMe<sub>2</sub>).

7-Метил-8-метиладель-10-(1'-D-рибитил)изоаллоксазин (VII). Водный раствор соединения (XIX), полученный из 1 г соединения (XVIII) и 0,38 г виолуровой кислоты, нагревали 3 ч при 90°. Воду отгоняли досуха, остаток растворяли в горячем спирте, фильтровали и частично упаривали. Осадок соединения (VII) отфильтровывали и промывали небольшим количеством спирта. Выход 0,28 г (31,2%).  $R_f$  0,63 (система 1), 0,24 (система 2), 0,39 (система 3).

Изучение биологической специфичности аминоканалогов рибофлавина (III) — (VII). Для изучения использовано несколько штаммов *B. subtilis* с различным уровнем синтеза витамина B<sub>2</sub> [6]. Использованы: прототрофный штамм *B. subtilis*, дающий возможность изучить B<sub>2</sub>-антагонистическую активность аналогов для подавления роста микроорганизмов; ауксотрофный по рибофлавиону мутант Rib B110 с неповрежденной системой регуляции активности рибофлавинового оперона, который на минимальной синтетической среде Спидайзена (содержащей 0,04 мкг/мл рибофлавина) накапливает непосредственный предшественник биосинтеза рибофлавина — 6,7-диметил-8-D-рибитиллюмазин (ДРЛ) (для которого характерна сине-зеленая флуоресценция) и тем самым позволяет выявить и оценить влияние специфичности аналогов-антиметаболитов на регуляторные функции рибофлавинового оперона и, следовательно, на подавление синтеза рибофлавина (этот же мутант на безвитаминной среде позволяет установить способность аналогов осуществлять коферментную функцию витамина B<sub>2</sub>); регуляторный мутант Rib C с дерепрессированным синтезом витамина B<sub>2</sub> (обладающий его сверхсинтезом), дающий возможность определить способность аналогов подавлять рост мутанта и влиять на накопление рибофлавина.

Исследование проводилось по методике, описанной в [6]. Изучение изменений регуляторных характеристик штаммов под действием аминоканалогов рибофлавина производили путем определения спектрофотометрически при 406 нм зависимости накопления ДРЛ в культуральной жидкости мутанта Rib B110 от концентрации аналогов (см. рис. 2). Предварительно определялось количество клеток в культуре (при 540 нм 10<sup>8</sup> клеток/мл соответствует оптической плотности 0,2), затем клетки отделялись центрифугированием и уровень синтеза ДРЛ пересчитывался в расчете на одну клетку. Зависимость удельной активности рибофлавинсинтетазы (последнего фермента в цепи биосинтеза рибофлавина и ДРЛ) от концентрации аминоканалогов рибофлавина в бесклеточном экстракте у мутанта Rib D107 (см. рис. 3) выражалась через отношение количества рибофлавина, образующегося за 1 мин, к количеству белка в пробе; количество рибофлавина определялось спектрофотометрически при 470 нм, при котором  $\epsilon$  составляет 9600 [7].

Для определения активности фермента клетки исследуемых штаммов ресуспендировали в 2,5 мл фосфатного буфера с pH 7,0, содержащего 0,01 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, вскрывали их на прессе под давлением 1250 кг/см<sup>2</sup> и после центрифугирования при 15 000 об/мин концентрацию белка в растворе оп-

ределяли по<sup>7</sup>Лоури. При измерении активности рибофлавинсинтетазы смешивали по 1 мл раствора субстрата (0,8мМ ДРЛ) и клеточного экстракта, сразу отбирали 1 мл смеси и приливали к ней 0,25 мл 25% раствора трихлоруксусной кислоты — эта проба служила нулевым отсчетом. Оставшийся 1 мл смеси инкубировали 15 мин при 37° и затем для остановки реакции к пробе добавляли 0,25 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Выпавший белковый осадок отделяли центрифугированием и определяли величину экстинкции рибофлавина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березовский В. М., Тульчинская Л. С., Полякова Н. А. (1965) Ж. общ. химии, 35, 673—677.
2. Тульчинская Л. С., Жилина Т. А., Клебанова В. Д., Полякова Н. А., Солодкина Л. М., Миронов В. А., Березовский В. М. (1972) Ж. общ. химии, 42, 1135—1138.
3. Miura R., Matsui K., Hirotsu K., Shimada A., Takatsu M., Otani Sh. (1973) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 703—704.
4. Otani Sh., Takatsu M., Nakano M., Kasai S., Miura R., Matsui K. (1974) J. Antibiotics, 27, 89—90.
5. Kasai S., Miura R., Matsui K. (1975) Bull. Chem. Soc. Japan, 48, 2877—2880.
6. Степанов А. И., Тульчинская Л. С., Березовский В. М., Кукапова А. Я. (1975) Генетика, 11, 116—124.
7. Plant G. W. E. (1963) J. Biol. Chem., 238, 2225—2243.

Поступила в редакцию  
11.VIII.1976

После доработки  
11.XI.1976

#### STUDIES ON ALLO- AND ISOALLOXAZINE. XLVI. SYNTHESIS AND BIOLOGICAL SPECIFICITY OF RIBOFLAVIN AMINO-ANALOGS

BEREZOVSKII V. M., STEPANOV A. I., POLYAKOVA N. A.,  
TULCHINSKAYA L. S., KUKANOVA A. Ya.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow*

Condensation of some substituted *m*-phenylenediamines with violuric acid results in new riboflavin amino-analogs — 8-dimethylamino(7,8-dinor)-riboflavin, 8-dimethylamino(nor)-2'-deoxyriboflavin, 8-dimethylamino(7,8-dinor)-2'-deoxyriboflavin, and 8-methylamino(nor)riboflavin. The compounds obtained have been characterized by the absorption and PMR-spectra, chromatographic mobility and the fluorescence data. It has been shown that the riboflavin amino-analogs inhibit the synthesis of 6,7-dimethyl-8-*D*-ribithyllumazine and suppress the riboflavinsynthetase activity in some *Bacillus subtilis* strains characterized by different state of riboflavin operon. The amino-analogs manifested the inhibition, which is competitive in respect to riboflavin, of growth of some strains of *B. subtilis*. The highest antimetabolic activity was observed for 8-dimethylamino(nor)riboflavin, its biospecificity towards riboflavin biosynthesis being supported by isolating *B. subtilis* mutants which are resistant to this analog and exhibit the «supersynthesis» of riboflavin.