



УДК 547.173.3.04:541.636

ЗАВИСИМОСТЬ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ СКОРОСТЕЙ РАЗРЫВА
СВЯЗЕЙ С—С И С—Н ТРЕОНИНОВОГО ФРАГМЕНТА ХИРАЛЬНЫХ
САЛИЦИЛИДЕН-ТРЕОНИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ Co^{3+}
ОТ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ЭФФЕКТОВ

Белоконь Ю. Н., Сагиян А. С., Сапорзская М. Б.,
Беликов В. М.

*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

Получены комплексы Λ - и Δ -бис[N-салицилиден-(S)-треонинато]кобальтат(III) натрия (Λ - и Δ -(I)), Λ - и Δ -бис[N-3-метилсалицилиден-(S)-треонинато]кобальтат(III) натрия (Λ - и Δ -(II)), Λ - и Δ -бис[N-7-метилсалицилиден-(S)-треонинато]кобальтат(III) натрия (Λ - и Δ -(III)).

Показано, что под действием оснований связь C^{α} -H треонинового фрагмента разрывается в 3 раза быстрее, чем его C^{α} - C^{β} -связь, как в Λ - и Δ -(I), так и в Λ - и Δ -(II). Стерическое экранирование H $^{\alpha}$ треонинового фрагмента в Λ -(II) замедляет его диссоциацию под действием оснований, но одновременно замедляет и скорость разрыва связи C^{α} - C^{β} в той же степени. При этом соотношение скоростей обоих процессов сохраняется постоянным. В противоположность этому в обоих изомерах комплекса (III) разрыв связи C^{α} -H замедляется в 100 раз вследствие стереоэлектронных эффектов по сравнению со скоростью разрыва связи C^{α} - C^{β} . Последний процесс проходит с константой скорости, близкой к константе скорости разрыва этой связи в других комплексах. Полученные результаты рассматриваются в применении к способности пиридоксальных ферментов катализировать только одну из многих возможных реакций аминокислоты.

Одной из самых важных черт энзиматического катализа является способность к селективному превращению субстрата. Пиридоксальные ферменты служат в этом отношении хорошим примером. В то время как в модельных системах пиридоксаль катализирует одновременно несколько реакций аминокислот (β -элиминирование, разрыв связи C—C, переаминирование и т. д. [1]), каждый отдельный пиридоксальный фермент катализирует преимущественно одно из таких превращений [1–5]. Данатан выдвинул гипотезу, позволяющую объяснить наблюдаемую селективность процесса с точки зрения стереоэлектронных эффектов [5]. Согласно этой гипотезе, разрыв той или иной связи аминокислоты определяется ориентацией этой связи относительно плоскости основания Шиффа, образованного пиридоксалью и аминокислотой. Связь, расположенная перпендикулярно этой плоскости, разрывается быстрее, чем остальные связи (схема 1). Подразумевается, что в холоферментативной системе отсутствует подвижное конформационное равновесие, представленное на схеме 1. В отсутствие же апофермента существуют все конформеры субстрата и идут одновременно все реакции (A—C).

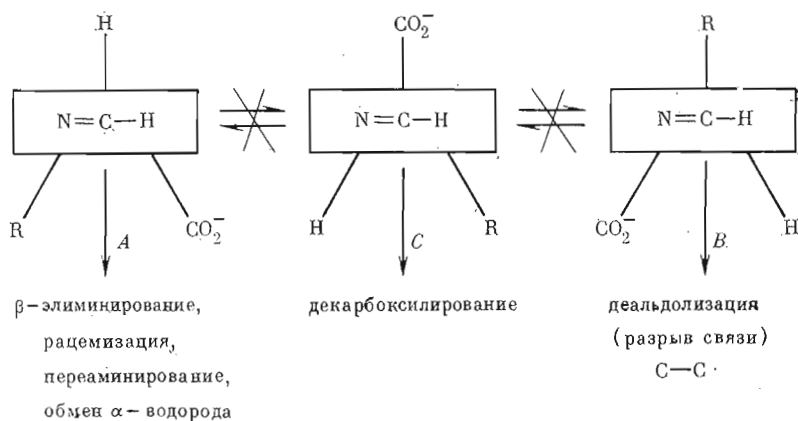
Несмотря на то что гипотеза Данатана о стереоэлектронном контроле является общепринятой, до настоящего времени не было убедительного экспериментального ее подтверждения на модельных системах.

Между тем возможен еще один способ стерического контроля направления реакции — селективное экранирование атаки основанием той или иной уходящей группы, приводящее к предпочтительности той или иной реакции.

В настоящей работе мы попытались на модельных системах сделать выбор между этими двумя способами стерического контроля направления реакции.

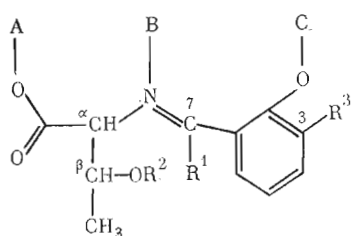
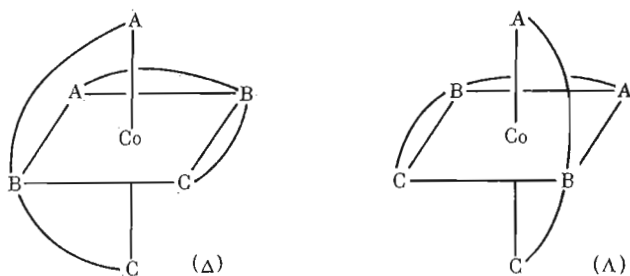
В качестве модельных систем мы выбрали хиральные октаэдрические комплексы Co^{3+} , образованные шиффовыми основаниями салицилового

Схема 1



альдегида, 3-метилсалицилового альдегида или 7-метилсалицилового альдегида (*o*-оксиацетофенона). Комплексы этого типа стереохимически инертны и не изменяют своей конфигурации в ходе химических трансформаций лигандов [6, 7]. В зависимости от расположения лигандов по правой или левой спирали относительно оси C_2 комплексы относят к Δ - или Λ -ряду (схема 2).

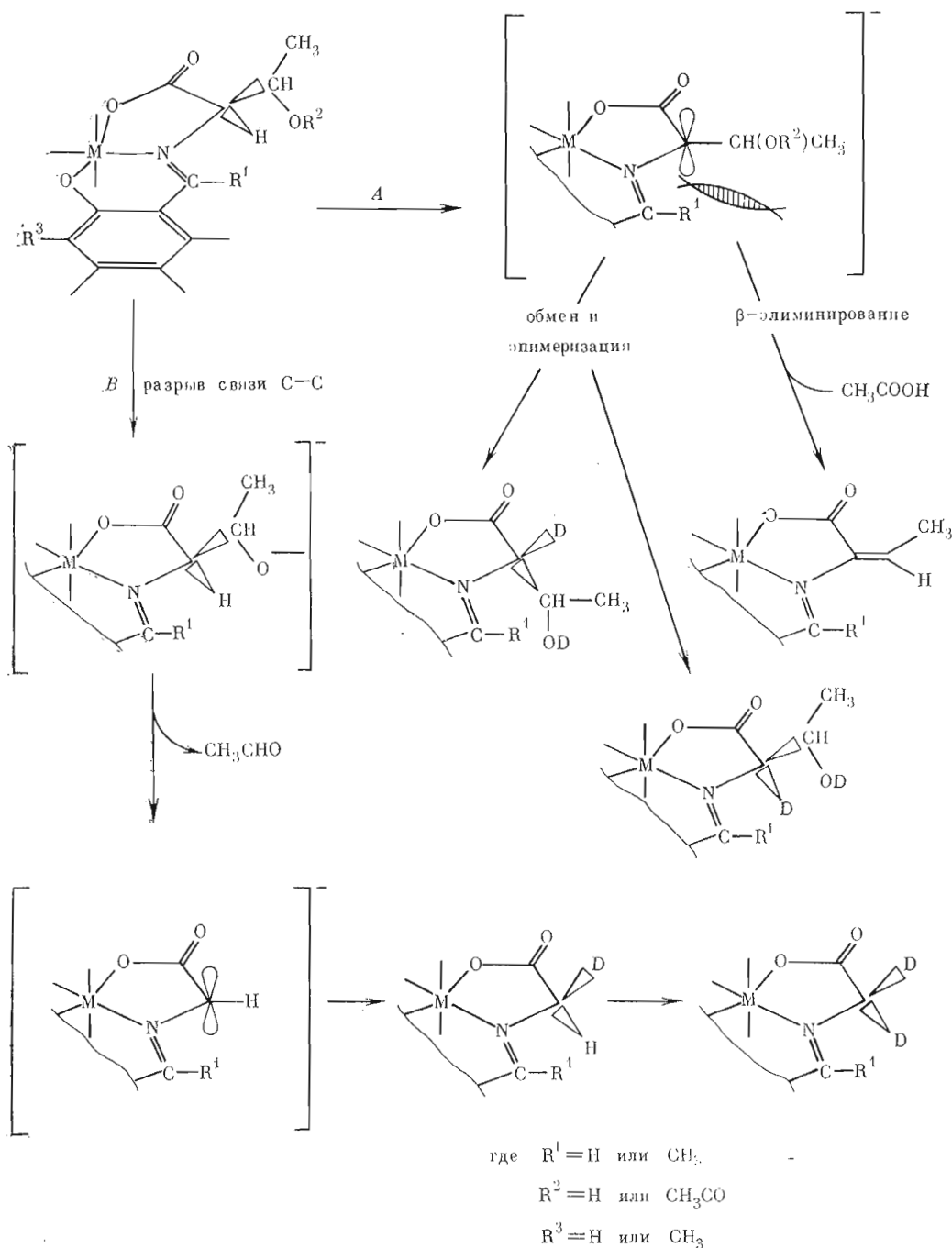
Схема 2



- (I) $R^1 = R^2 = R^3 = H$
 (II) $R^1 = R^2 = H, R^3 = CH_3$
 (III) $R^1 = CH_3, R^2 = R^3 = H$

В качестве критерия оценки вклада того или другого стерического эффекта в превращение комплексов под действием оснований мы приняли отношение скоростей разрыва связей $C^\alpha-H$ и $C^\alpha-C^\beta$. В соответствии со схемой 3 это отношение определяется как $k_{обм}/k_{разр}$. Δ -Бис[N-салицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтат(III) натрия (Δ -I) выбран нами как основное вещество для сравнения.

Введение метильной группы в положение 3 салицилового альдегида приводит к экранированию атаки основанием α -протона аминокислотного фрагмента в комплексах Λ -конфигурации и ухода оксиэтильной группы в комплексах Δ -конфигурации (рис. 1а, б). Зависимость или независимость относительных скоростей разрыва связей $C^\alpha-H$ и $C^\alpha-C^\beta$ от наличия метильной группы указала бы на наличие или отсутствие стерического контроля.



С другой стороны, введение метильной группы в положение 7 вынуждает оксиэтильную группу как для Δ -, так и для Λ -комплексов принять аксиальное положение, что соответствует конформации, представленной на рис. 2а, б. Сильное различие в скоростях обмена и разрыва свидетельствовало бы в соответствии с гипотезой Данатана о стереоэлектронном контроле реакции.

Комплексы, использованные в настоящей работе, были синтезированы взаимодействием (*S*)-Thg, замещенного салицилового альдегида и $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO})_3]$ в воде.

Λ - и Δ -комплексы (I) и (II) были получены ранее [6, 7], комплексы (III) получены впервые. Данные ^1H -ЯМР-спектров и элементного ана-

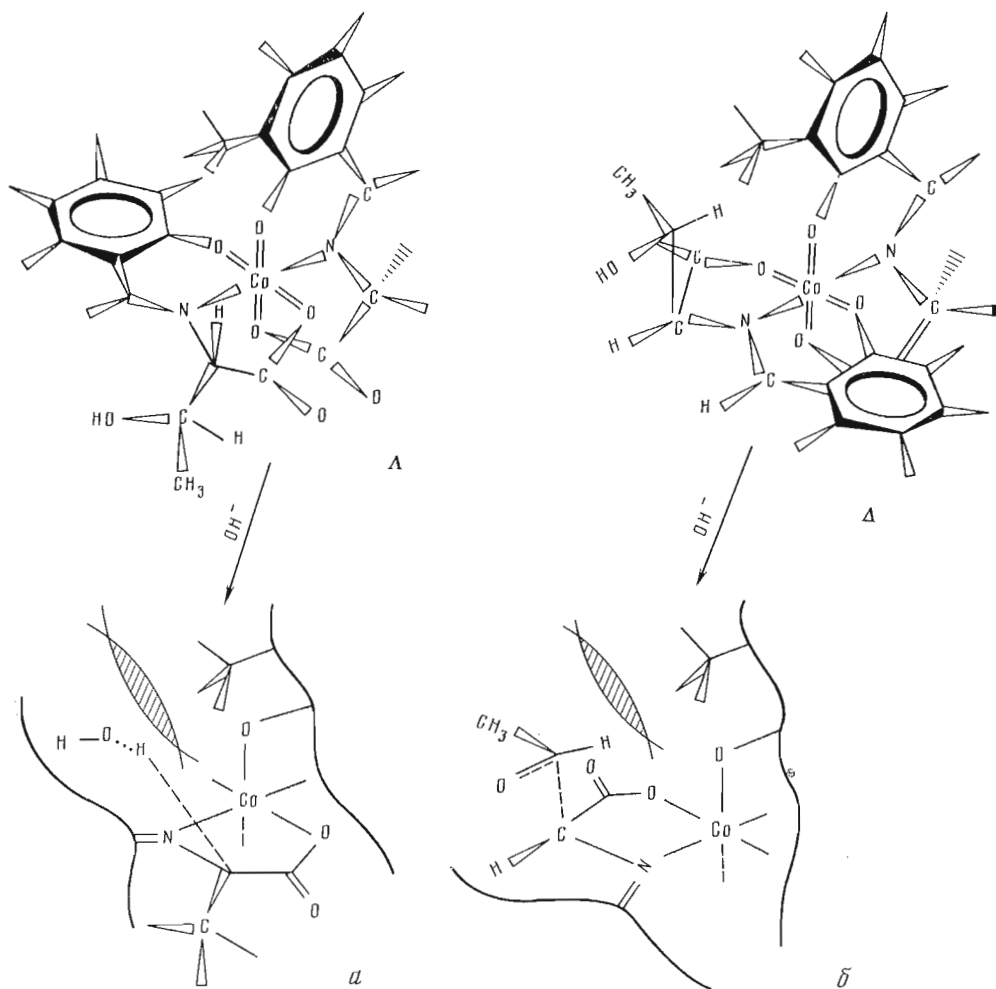


Рис. 1. *а* – стерическое экранирование атаки основания на α -протон треонинового фрагмента в комплексе Λ -бис[*N*-3-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата (III) натрия (Λ -II); *б* – стерическое затруднение ухода оксиэтильной группы в комплексе Δ -бис[*N*-3-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата (III) натрия (Δ -II)

лиза (см. «Экспериментальную часть») комплексов (III) соответствуют ожидаемым. На рис. 3 представлены кривые ДОВ двух диастереомеров комплекса (III). Сравнение вычисленной «конфигурационной» составляющей этих кривых с кривой ДОВ Λ -бис[*N*-салицилиденглициinato]кобальтата (III) натрия, полученного нами ранее [6, 7], показывает, что изомер комплекса (III) с большей подвижностью при хроматографии в тонком слое Al_2O_3 имеет конфигурацию Λ (кривые 3 и 4 аналогичны), а медленно движущийся диастереомер – конфигурацию Δ . Из обоих диастереомеров после электрохимического восстановления [8] выделен (*S*)-Thr. Таким образом, они различаются конфигурацией комплексов и имеют ту же конфигурацию аминокислотного фрагмента ($\Lambda(SS)$ и $\Delta(SS)$). В D_2O под действием оснований (pD 11,4, карбонатный буферный раствор) остаток Thr в диастереомерных комплексах (I) и (II) вступает в реакцию обмена α -протона, сопровождающуюся эпимеризацией с образованием *allo*-Thr. Одновременно происходит распад остатка Thr на ацетальдегид и Gly (т. е. разрыв связи $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$). Методика контроля включала в себя как измерение уменьшения площади сигнала α -протона остатка Thr в спектрах ^1H -ЯМР, так и количественный и энантиомерный анализ образующихся аминокислот (см. «Экспериментальную часть» и табл. 1). При этом образующийся *allo*-Thr имел только *R*-конфигурацию, Thr сохранял *S*-конфигурацию. Таким образом, суммарный наблюдаемый процесс описывается

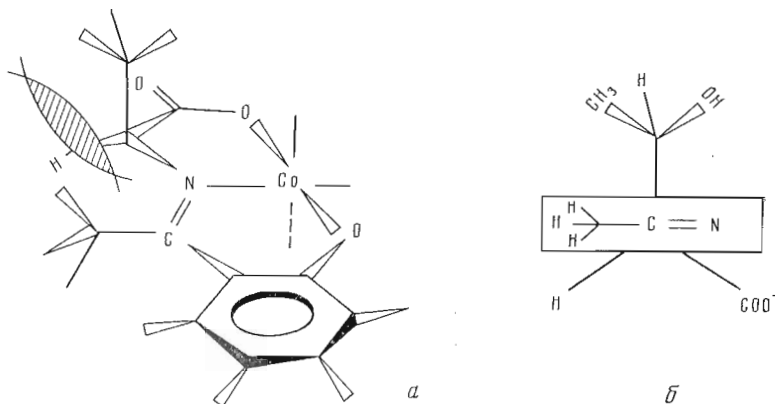


Рис. 2. Конформация Λ - и Δ -бис[N-7-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата(III) натрия (а) и проекция комплекса со стороны бензольного ядра (б)

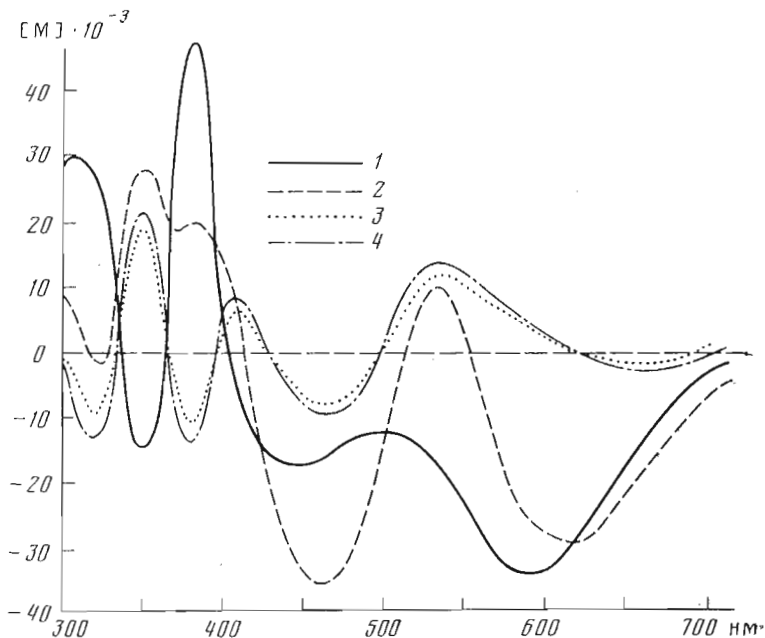


Рис. 3. Кривые ДОВ в H_2O при $25^\circ C$ Δ -бис[N-7-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата(III) натрия (Δ -(III)) (1), Λ -бис[N-7-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата(III) натрия (Λ -(III)) (2), Λ -бис[N-салицилиденглицинато]кобальтата(III) натрия (3) и конфигурационная составляющая кривой ДОВ комплекса Λ -(III) (4)

схемой 3. Константы скорости разрыва связи C—C ($k_{разр}$) рассчитывались по скорости накопления Gly, константы скорости инверсии остатка Thr ($k_{инв}$) — по скорости накопления (*R*)-*allo*-Thr на начальных участках реакции. Наблюдаемая константа скорости обмена α -водорода треонинового фрагмента ($k_{обм}^{набл}$) рассчитывалась по уменьшению площади его сигнала в 1H -ЯМР-спектрах. Эта величина характеризует одновременно и обмен α -водорода, и разрыв связи C—C, так как образующийся при разрыве связи C—C глициновый комплекс обменивает α -водород в условиях эксперимента быстрее, чем исходный треониновый комплекс. Так, для иона бис[N-салицилиденглицинато]кобальтата(III) $k_{обм} = 6 M^{-1} \cdot c^{-1}$, для иона бис[N-3-метилсалицилиденглицинато]кобальтата(III) константы скоростей обмена прохиральных водородов равны 5,5 и $0,48 M^{-1} \cdot c^{-1}$ соответственно [6, 7]. Истинная константа скорости обмена ($k_{обм}$) для Thr может быть вычислена как разность между $k_{обм}^{набл}$ и $k_{разр}$. Как видно из табл. 2,

Распад Λ - и Δ -диастереомеров комплексов (I)–(III) в карбонатном буферном растворе в D_2O при $25^\circ C$ и pD 11,4 *

Соединение	Время, мин	(S)-Thr	(R)-allo-Thr	Gly
		мол. %		
Λ -(I)	0	100	0	0
	15	77,1	9,5	13,5
	60	45,0	22,5	32,4
Δ -(I)	0	100	0	0
	15	80,1	8,9	10,2
	45	50	17,3	32,5
Λ -(II)	0	100	0	0
	15	88,9	7,4	3,7
	60	79,5	12,1	8,4
Δ -(II)	0	100	0	0
	20	75,9	12,03	9,3
	40	66,9	16,5	16,5
Λ -(III)	0	100	0	0
	15	88,4	0	11,6
	30	82,1	0	17,8
Δ -(III)	0	100	0	0
	15	83,5	0	11,5
	45	71,5	0	28,5
	60	62,5	0	37,5

* В реакционных смесях не было обнаружено ни (R)-Thr, ни (S)-allo-Thr.

Таблица 2

Константы скорости инверсии треонинового остатка, разрыва связи $C^\alpha-C^\beta$ и дейтерообмена в нем в Λ - и Δ -диастереомерах комплексов (I)–(III) ($k \cdot 10^2, M^{-1} \cdot c^{-1}$)*

Соединение	$k_{разр}$	$k_{инв}$	$k_{обм}^{набл}$	$k_{обм}$	$k_{обм}/k_{разр}$
Λ -(I)	21,8±2,6	13,8±0,2	97,3±13,4	75,5	3,5
Δ -(I)	25,7±3,0	12,0±1,8	98,4±5,51	72,7	2,8
Λ -(II)	4,5±1,4	6,5±2,8	20,0±0,2	15,5	3,5
Δ -(II)	17,1±1,0	16,5±1,8	76,9±5,9	59,8	3,6
Λ -(III)	16,4±0,6	**	**	**	<0,01 **
Δ -(III)	18,3±1,6	**	**	**	<0,01 **

* В D_2O при $25^\circ C$ и I 0,07 под действием OD^- -иона в карбонатных буферных растворах $k_{разр}$ — константа скорости разрыва связи $C-C$ фрагмента Thr, $k_{инв}$ — константа скорости накопления allo-Thr, $k_{обм}^{набл}$ — наблюдаемые константы скорости уменьшения интенсивности сигнала α -водорода треонинового фрагмента в спектрах 1H -ЯМР; $k_{обм}$ — истинная константа скорости обмена α -протона треонинового фрагмента вычислена как $k_{обм}^{набл} = k_{обм} - k_{разр}$.

** Экспериментально не наблюдается (соотношения $k_{обм}^{набл}/k_{разр}$ оценивались как описано в тексте).

в комплексах (I) и (II) обмен α -водорода происходит с частичным сохранением конфигурации и скорость обмена приблизительно в 3 раза больше, чем скорость разрыва связи $C-S$.

Поведение комплексов, полученных на основе *o*-оксиацетофенона, принципиально в этом отношении отличается. Так, анализ аминокислот, образовавшихся в ходе обработки Λ - и Δ -изомеров (III) содовым буфером в D_2O , показывает наличие только треонина и глицина и полное отсутствие (R)-allo-Thr. Одновременно уменьшение площади сигнала α -протона фрагмента происходит с той же скоростью, что и уменьшение площади

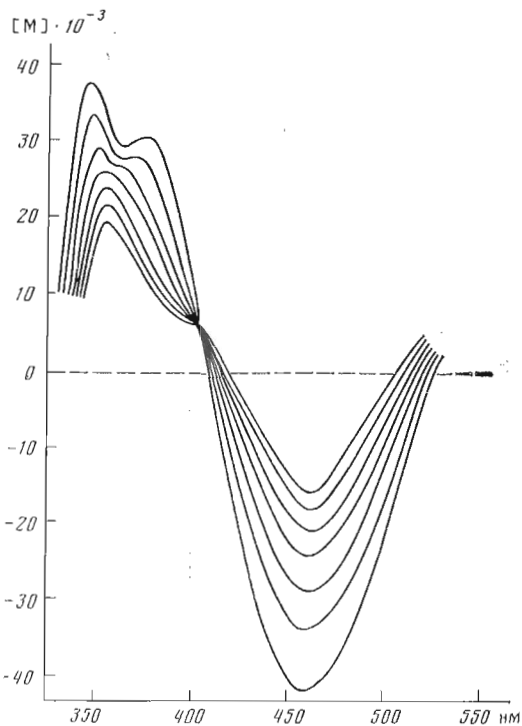


Рис. 4

Рис. 4. Изменение кривой ДОВ комплекса А-(III) в карбонатном буфере, рН 11,0, при 25° С

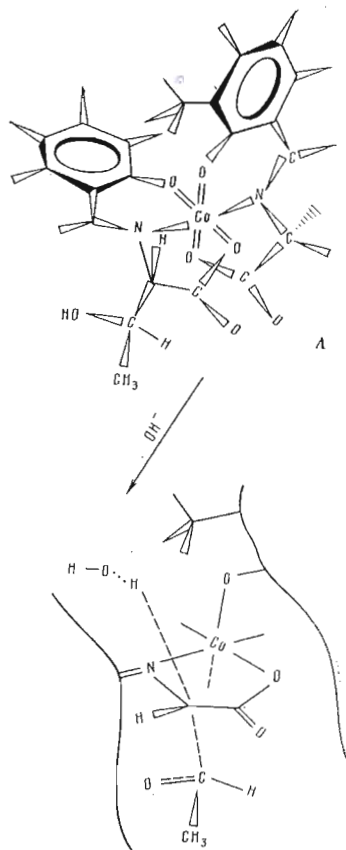


Рис. 5

Рис. 5. Стерическое экранирование сольватации промежуточного образующегося при разрыве связи С-С карбаниона в комплексе А-(II)

сигналов протонов метильной группы Thr. Это свидетельствует об отсутствии заметного обмена α -протона фрагмента Thr в этих условиях. Процесс разрыва связи С-С не сопровождается рацемизацией по иону металла, о чем свидетельствуют изовращательные точки кривых ДОВ, снятых в ходе распада остатка Thr, не лежащие на нулевой линии (рис. 4). В табл. 2 приведена константа скорости разрыва связи С-С (второго порядка, учитывая специфический катализ процесса ионом OD^-). Как видно из представленных данных, разрыв связи С-С в комплексах (III) происходит со скоростями, сравнимыми с соответствующими скоростями для других комплексов.

Относительную подвижность α -протона треонинового фрагмента в комплексах (III) можно оценить лишь косвенным путем по скорости β -элиминирования уксусной кислоты из производных этого комплекса, в которых гидроксильная группа треонина ацетилирована. Ранее мы показали, что этот процесс для Δ -изомера (I) описывается механизмом $(E1cB)_I$ [9] со стадией отрыва α -протона, лимитирующей скорость процесса. Деацетилирование соответствующего производного комплекса Δ -(III) под действием буфера Dabco описывается выражением $k_{\text{a.c.}} = k_0 + k_B [\text{Dabco}]$. За ходом деацетилирования удобно следить по увеличению поглощения при $24\,000\text{ см}^{-1}$, сопровождающего появления фрагмента аминокислотной кислоты. Константы скорости общесредственного катализа деацетилирования k_0 и k_B равны для О-ацетил- Δ -7 (III) соответственно $4 \cdot 10^{-4}\text{ с}^{-1}$ и $7,2 \cdot 10^{-3}\text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, а для О-ацетил- Δ -(I) — $1,98 \cdot 10^{-2}\text{ с}^{-1}$ и $1\text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Как видно из этих данных, деацетилирование происходит

в 50–150 раз медленнее для комплекса Δ -(III), чем для Δ -(I). Иными словами, введение метильной группы при двойной альдиминной связи резко уменьшает подвижность α -протона аминокислотного фрагмента и мало влияет на скорость разрыва связи C–C.

Полученные результаты могут быть интерпретированы в рамках гипотезы Данатана. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, в металлических комплексах шиффовых оснований салицилового альдегида или пиридоксала с аминокислотами боковая группа аминокислоты имеет псевдоксиальную ориентацию [6, 7, 10–13] из-за стерических взаимодействий альдиминного водорода с этой группой [6, 7, 14–16]. Замена альдиминного водорода на метильную группу должна вызывать из-за увеличения стерических взаимодействий еще более ярко выраженную аксиальную ориентацию оксиэтильной группы. Те же факторы приводят к тому, что переходное состояние разрыва связи C–H, напоминающее, по-видимому, плоский карбанион, стерически больше затруднено из-за взаимодействия оксиэтильной и метильной групп для оксацетофеноновых комплексов (III), чем для салицилальдегидных комплексов (I) и (II), где оксиэтильная группа взаимодействует с альдиминным водородом (схема 3, путь A). Переходное состояние при разрыве связи C–C (схема 3, путь B), также напоминающее плоский карбанион с взаимодействием α -водорода с альдиминным водородом или NH_2 -группой при $-\text{C}=\text{N}$ -связи, по энергии мало различается для ацетофеноновых и салицилальдегидных комплексов. Поэтому разрыв связи C–C происходит с приблизительно одинаковыми скоростями для Δ - и Δ -комплексов (I) и (III), а разрыв связи C–H в комплексах (III) селективно замедляется.

Другой возможный путь стерического контроля — гидрофобное экранирование атаки основания на α -протон остатка Thr — не может в изучаемых системах изменить относительные скорости разрыва связей C–C и C–H. Так, в Δ -изомере (II) метильная группа в положении 3 салицилового альдегида экранирует атаку основания на α -протон фрагмента Thr соседнего лиганда (см. рис. 1а). Однако разрыв связей C–C и C–H в Δ -изомере (II) замедляется в одинаковой степени, как это видно из сравнения с комплексом Δ -(I) (табл. 2), где в положении 3 салицилового альдегида находится водород. Возможно, причина заключается в том, что стерическое экранирование атаки на α -протон фрагмента Thr (рис. 1а) и сольватация промежуточного образующегося при разрыве связи C–C карбаниона (рис. 5) испытывают аналогичные стерические затруднения. Если механизм разрыва связи C–C треонина близок к S_E2 , как в случае ретроальдольного распада с образованием нестабильных карбанионов [17], то такое стерическое затруднение может полностью объяснить наблюдаемое замедление разрыва связи C–C.

Таким образом, из двух возможных способов стерического контроля направления реакции: жесткой фиксации ориентации разрывающихся связей относительно π -системы шиффова основания и стерического затруднения подхода основания к той или другой уходящей группе — первый способ наиболее эффективен и позволяет направить реакцию по одному пути.

Экспериментальная часть

Использовали аминокислоты фирмы Reanal (их энантиомерная чистота определялась методом ГЖХ [18]), ионообменную смолу Dowex-50 \times 8 (Serva), Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals), 1,4-дизабициклооктан (Dabco) фирмы Merck; *o*-оксиацетофенон, D_2O , Na_2CO_3 и NaHCO_3 (Союзреактив).

Карбонатные буферные растворы в D_2O готовили согласно [19], растворы NaOD в D_2O — добавлением металлического натрия в атмосфере аргона. Концентрацию OD^- в D_2O определяли потенциометрическим титрованием, рD буферного карбонатного раствора — с помощью стеклянного электрода, исходя из $\text{pD} = \text{pH} + 0,4$, где pH — наблюдаемый pH раствора. Концентрация OD^- была рассчитана из уравнений $\text{pOD} = \text{p}K_{\text{D}_2\text{O}} - \text{pD}$, где $\text{p}K_{\text{D}_2\text{O}} 14,71$ [20].

Спектры ^1H -ЯМР снимали на приборах Tesla-467A (60 МГц) и Bruker-WP (200 МГц). Поляриметрические измерения проводили на поляриметре Perkin — Elmer 241. Электронные спектры получали на приборе Spesord UV VIS, кривые ДОВ снимали на приборе Jasco ORD/UV-5.

*Синтез диастереомеров Λ - и Δ -бис[*N*-7-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата (III) натрия (Λ -III) и (Δ -III)* проводили по модифицированной методике Байлара [21]. Раствор, содержащий 4,56 г (40 ммоль) (*S*)-треонина, 2,24 г (40 ммоль) КОН в 200 мл абсолютного спирта, нагревали до полного растворения КОН, охлаждали до 20° С, добавляли 5,54 г (40 ммоль) *o*-оксиацетофенона в 10 мл спирта, перемешивали 10 мин в присутствии молекулярных сит Wolfen Zeosorb 3 Å, отделяли от сит и добавляли одновременно с 1 н. раствором HNO_3 в H_2O (80 мл) при энергичном перемешивании в атмосфере аргона к 7,2 г (23 ммоль) $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3]$ и 0,2 г активированного угля в 40 мл абсолютного спирта. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 60° С, фильтровали, упаривали досуха в вакууме, остаток растворяли в спирте, фильтровали и упаривали. По данным ТСХ на Al_2O_3 (спирт), остаток содержит смесь Λ - и Δ -диастереомеров, которые были разделены путем дробной кристаллизации в системе спирт — бензол (1 : 2). При этом Λ -диастереомер выпадает, а Δ -изомер остается в растворе. После трехкратной кристаллизации диастереомеры удалось полностью разделить. Δ -Диастереомер дополнительно очищали от минеральных солей на колонке с сефадексом LH-20 (2,5×18 см) в системе спирт — бензол (1 : 2).

Δ -(III): выход 3,02 г (30%). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 1,39 (д, 3H, *J* 6,2 Гц, CH_3 Thr), 2,80 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{—C}=\text{N}$), 3,95—4,3 (м, 1H, β -H), 4,58 (д, 1H, *J* 7,4 Гц, α -H), 6,33—7,75 (м, 4H, C_6H_4). Найдено, %: С 48,22; Н 5,49; N 4,40. $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8\text{CoNa} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 48,24; Н 5,23; N 4,68.

Λ -(III): выход 1,66 г (17%). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 1,4 (д, 3H, *J* 6,2 Гц, CH_3 Thr), 2,78 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{—C}=\text{N}$), 3,93—4,28 (м, 1H, β -H), 4,7 (д, *J* 9 Гц, α -H), 5,8—7,55 (м, 4H, C_6H_4). Найдено, %: С 47,37; Н 4,98; N 4,31. $\text{C}_{24}\text{H}_{26} \cdot \text{N}_2\text{O}_8\text{CoNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 47,53; Н 5,31; N 4,61.

Определение энантиомерной чистоты треонина в Λ - и Δ -диастереомерах комплексов (I) — (III). 0,1 г каждого диастереомера восстанавливали электрохимически по методике [8], *o*-оксиацетофенон экстрагировали эфиром, водный раствор веществ пропускали через колонку (1,4×4 см) с дауэксом А-1 для отделения Co^{2+} , элюат пропускали через колонку (3,0×14 см) с дауэксом 50×8 в H^+ -форме, промывали дистиллированной водой и аминокислоту вымывали 5% раствором аммиака. Аммиачный раствор упаривали в вакууме, сухой остаток анализировали методом ГЖХ. Энантиомерная чистота *L*-Thr во всех диастереомерах составляла ~99%.

Кинетика и стереохимия инверсии треонинового фрагмента, разрыва $\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta$ -связи и дейтерообмена в нем в Λ - и Δ -диастереомерах комплексов (I) — (III). а) *Спектрополяриметрический метод*. В 10-мм кювету спектрополяриметра Jasco ORD/UV-5 в атмосфере аргона вносили 1,3 мг ($2,1 \cdot 10^{-6}$ моль) комплекса Λ -(III), растворяли в 3 мл карбонатного буферного раствора в D_2O (рD 11,4) и снимали кривые ДОВ через определенные промежутки времени (рис. 4).

б) *Метод ГЖХ*. В 70 мл карбонатного буферного раствора в D_2O (рD 11,4) в атмосфере аргона при 25° С и непрерывном перемешивании растворяли 0,5 г ($8,3 \cdot 10^{-4}$ моль) Δ -(III) и Λ -(III)*, через каждые 15 мин отбирали 10 мл пробы и нейтрализовали их 0,4 мл 1 н. H_3PO_4 в атмосфере аргона. Для определения констант скоростей дейтерообмена все пробы упаривали досуха, растворяли в смеси спирт — бензол (1 : 2), фильтровали, снова упаривали досуха. Остаток растворяли в минимальном количестве D_2O , упаривали досуха и снимали ^1H -ЯМР-спектры в CD_3OD . Для определения констант скоростей разрыва связей C—C и C—H в каждую пробу перед электрохимическим разложением добавляли 10,2 мг внутреннего аминокислотного стандарта (*S*)-Ala (95% оптической чистоты). Электро-

* $\{\text{Co}[\text{7-CH}_3\text{-салицилиден-(S)-Thr}]_2\} \cdot \text{Na} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$.

химическое разложение комплексов, количественный и энантиомерный анализ аминокислот проводили как описано выше.

Аналогичным образом изучали распад (*S*)-Thr в Δ - и Δ -изомерах комплексов (I) и (II). Результаты представлены в табл. 1. Сумма аминокислот в ходе эксперимента оставалась постоянной и равной количеству аминокислот в исходном комплексе (см. табл. 1). Селективных потерь аминокислот в ходе их выделения не наблюдалось.

*Ацетилирование Δ -бис[*N*-7-метилсалицилиден-(*S*)-треонинато]кобальтата(III) натрия (Δ -(III)).* 1 г ($1,67 \cdot 10^{-3}$ моль) комплекса Δ -(III) растворяли в 20 мл безводного ацетонитрила и добавляли 0,8 мл пиридина. Затем при охлаждении ($0-2^\circ\text{C}$) и постоянном перемешивании в атмосфере аргона по каплям добавляли 6 мл уксусного ангидрида. Перемешивание и охлаждение продолжали еще 1 ч. Реакционную смесь оставляли при охлаждении ($0-2^\circ\text{C}$) на 24 ч, затем добавляли 15 мл спирта и упаривали при $45-50^\circ\text{C}$ в вакууме. Сухой остаток растворяли в спирте, пропускали через слой (2×10 см) Al_2O_3 для удаления пиридина и элюировали спиртом. Элюат упаривали досуха, сухой остаток растворяли в минимальном количестве смеси бензол—этанол (2:1) и хроматографировали на сефадексе LH-20 (2×100 см), элюируя смесью бензол—этанол, 2:1. Основную фракцию, содержащую *O*-ацетилированный комплекс Δ -(III), упаривали и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Выход 1,06 г (95%).

¹H-ЯМР (δ , м.д.): 1,38 (д, 3H, *J* 6,2 Гц, CH_3 Thr), 1,87 (с, 3H, OAc), 2,86 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 4,85 (д, 1H, α -H), 5,66 (м, 1H, β -H), 6,45–7,74 (м, 4H, C_6H_4). Найдено, %: C 49,98; H 5,12; N 4,21. $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{CoNa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: C 50,0; H 5,09; N 4,16.

*Кинетика деацелирования *O*-ацетилпроизводного Δ -(III) в буфере Dabco в воде при 25°C .* К 1,4 мл буферного раствора добавляли 0,1 мл раствора $7,0 \cdot 10^{-3}$ г ($1,4 \cdot 10^{-5}$ моль) *O*-ацетилпроизводного Δ -(III) $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 2 мл спирта. Раствор переносили в термостатированную при 25°C кювету спектрофотометра Spereord UV VIS и регистрировали изменение поглощения при $24\,000\text{ см}^{-1}$. Использовались буферные растворы, pH 9,4 (*I* 0,3, Dabco : Dabco \cdot HCl, M : M — 0,51 : 0,24; 0,25 : 0,12; 0,17 : 0,08; 0,12 : 0,06). Буферные растворы меньших концентраций готовили, разбавляя исходный раствор (0,5 M : 0,24 M) 0,3 M KCl.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. The Enzymes / Eds Boyer P. D., Lardy H., Mirbäck K. N. Y.: Acad. Press, 1960, v. 2, p. 113–181.
2. Braunstein A. E. The Enzymes / Eds Boyer P. D., Lardy H., Mirbäck K. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 9, p. 379–481.
3. Bruice T. C., Benkovic S. J. Bio-organic mechanism / Ed. Benjamin W. A. N. Y.: Acad. Press, 1966, v. 2, chapter 8.
4. Videras J. C., Floss H. G. Acc. Chem. Res., 1980, v. 13, p. 455–463.
5. Dunathan H. C. Advan. Enzymes, 1971, v. 35, p. 79–134.
6. Belokon' Yu. N., Belikov V. M., Vitt S. V., Savel'eva T. F., Burbelo V. M., Bakhmutov V. I., Aleksandrov G. G., Struchkov Yu. T. Tetrahedron, 1977, v. 33, № 19, p. 2551–2564.
7. Belokon' Yu. N., Melikyan A. S., Savel'eva T. F., Bakhmutov V. I., Vitt S. V., Belikov V. M. Tetrahedron, 1980, v. 36, № 16, p. 2327–2335.
8. Белокопъ Ю. Н., Савельева Т. Ф., Каргинов В. А., Саноровская М. Б., Бажмутов В. И., Великов В. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1977, № 5, с. 1081–1086.
9. Belokon' Yu. N., Sagiyan A. S., Ponomarenko I. V., Bakhmutov V. I., Belikov V. M. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1984, in press.
10. Willstadter E., Hamor T. A., Hoard J. L. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 8, p. 1205–1206.
11. Cutfield J. F., Hall D., Waters T. N. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1967, № 15, p. 785–786.
12. Capasso S., Giordano F., Mattia C., Mazzarella L., Ripamonti A. J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1974, v. 20, № 20, p. 2228–2233.
13. Aoki K., Yamazaki H. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1980, № 9, p. 363–365.
14. Casella L., Gullotti M. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 21, p. 6338–6347.
15. Casella L., Gullotti M., Pasini A., Rockenbauer A. Inorg. Chem., 1979, v. 18, № 10, p. 2825–2835.
16. Casella L., Gullotti M., Pacchioni G. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 9, p. 2386–2396.
17. Thibblin A., Jencks W. P. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 17, p. 4963–4973.

18. Nakaparksin S., Birrel P., Gil Av. E., Oro Y. J. Chromatogr. Sci., 1970, v. 8, № 4, p. 177-182.
19. Linnet N. In: pH measurement in theory and practice. Copenhagen, 1970, p. 161.
20. Wynne-Sones W. F. K. Trans. Faraday Soc., 1936, v. 32, p. 1397.
21. Burrows R. C., Bailar John C., Jr. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 18, p. 4150-4157.

Поступила в редакцию
6.VII.1984

A DEPENDENCE OF RELATIVE RATES OF THE C—C AND C—H BOND RUPTURE IN THE THREONINE FRAGMENT OF CHIRAL N-SALICYLIDENE THREONINATE Co³⁺ COMPLEXES ON STERIC EFFECTS

BELOKON' Yu. N., SAGIYAN A. S., SAPOROVSKAYA M. B., BELIKOV V. M.

*Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The complexes of sodium Λ - and Δ -bis[N-salicylidene-(*S*)-threoninato]cobaltate(III) (Λ , Δ -BSTC), Λ - and Δ -bis[N-3-methylsalicylidene-(*S*)-threoninato]cobaltate(III) (Λ , Δ -BMSTC), Λ - and Δ -bis[N-7-methylsalicylidene-(*S*)-threoninato]cobaltate(III) (Λ , Δ -7-BMSTC) were obtained. It was shown that under the action of bases C $^{\alpha}$ -H bond of threonine is broken three times faster than its C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ bond both in Λ - and Δ -BSTC or Λ - and Δ -3-BMSTC. The steric shielding by the 3-methyl group of the H $^{\alpha}$ of the Thr-fragment in Λ -3-BMSTC slows down its base-induced dissociation, the C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ bond dissociation rate also diminishing to the same extent. Thus the ratio of rates for both processes remains constant. On the contrary, in Λ - and Δ -7-BMSTC the C $^{\alpha}$ -H bond cleavage is slowed down 100 times due to the stereoelectronic effects, as compared to that of the C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ bond. The latter process is characterized by the rate constant close to that for the other complexes. The results obtained are discussed with inference to the ability of B $_6$ -dependent enzymes to choose only one of many possible avenues of amino acid reactivity.