



УДК 547.382.3.057:541.144

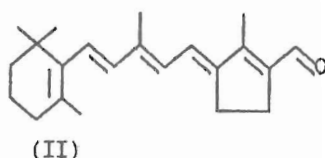
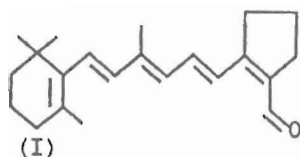
© 1993 Ю. Г. Кириллова, С. В. Еремин,
Л. В. Хитрина*, Б. И. МицнерЦИКЛОПЕНТЕНОВЫЙ И ЦИКЛОГЕКСЕНОВЫЙ АНАЛОГИ РЕТИНАЛЯ
ПО-РАЗНОМУ РЕАГИРУЮТ С БАКТЕРИООПСИНОМ

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;
* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета

Осуществлен синтез циклопентенового и циклогексенового аналогов 13-*цис*-ретиная конденсацией по Йоичу 9-пропинил- β -ионола с соответствующими циклическими β -кетоацетальми. При тестировании аналогов в реакции ресинтеза с бактериоопсином в составе апомембран *Halobacterium halobium* показано, что циклопентеновый аналог 13-*цис*-ретиная образует соответствующий аналог бактериородопсина, который обладает способностью к фотоиндуцированному гидролизу. Взаимодействие циклогексенового аналога 13-*цис*-ретиная останавливается на стадии образования нековалентного комплекса.

Простетической группой хромопротеида бактериородопсина из пурпурных мембран *Halobacterium halobium* является протонированный альдимин ретиная (альдегида витамина А), связанный с ϵ -аминогруппой Lys²¹⁶ полипептидной цепи белка [1]. Функционирование бактериородопсина как светозависимой протонной транслоказы сопряжено с 13-*транс*- \rightleftharpoons 13-*цис*-изомеризацией его хромофорной группы [2]. Для исследования хромофор-белкового взаимодействия в молекуле бактериородопсина и его влияния на протонтранслоцирующую функцию этого ретинилиденпротеида успешно используют подход, заключающийся в изучении свойств искусственных пигментов, сформированных взаимодействием аналогов 13-*цис*- или полностью-*транс*-ретиная и апобелка — бактериоопсина [3].

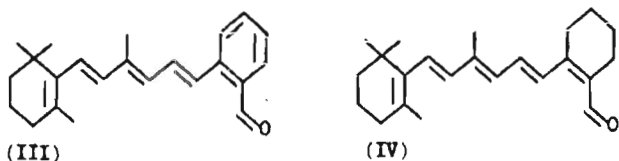
Ранее были синтезированы аналоги ретиная [2, 4, 5], содержащие в полиеновой цепи циклический фрагмент, который исключает *цис*- \rightleftharpoons *транс*-изомеризацию конкретной C=C-связи. Несомненный интерес представляют полученные К. Наканиши с сотр. [2] аналоги ретиная (I, II), которые содержали циклопентеновое кольцо и имели закрепленную 13-*цис*- и 13-*транс*-конфигурацию кратной связи соответственно.



Оба аналога при регенерации с мембранными препаратами бактериоопсина (апомембранами) образовывали пигменты со значениями максимумов поглощения (для аналога (I) 548 нм, для аналога (II) 576 нм), близких к нативному белку,

что свидетельствует о хорошем соответствии модифицированной структуры полиеновой цепи ее белковому окружению (для сравнения λ_{\max} бактериородопсина: форма, адаптированная к темноте, — 558 нм, к свету — 568 нм, а пигмент, содержащий индивидуальный 13-*цис*-хромофор, — 548 нм). У полученных пигментов не выявлена ни способность к световой и темновой адаптации, ни фотоиндуцированный транспорт протонов.

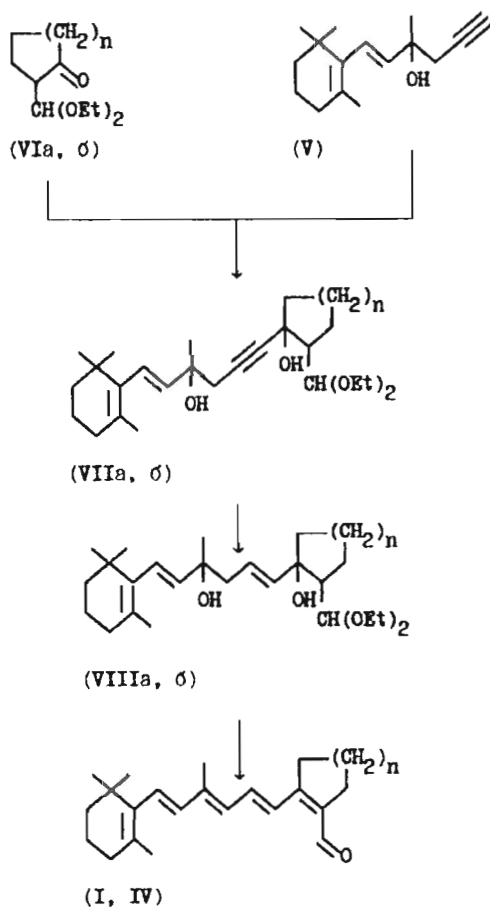
Взаимодействие синтезированного ранее аналога 13-*цис*-ретинала, содержащего ароматическое кольцо (III), с бактериоопсином завершилось на стадии образования нековалентного комплекса (λ_{\max} 343 нм), неспособного к дальнейшему превращению в аналог бактериородопсина [6].



Одна из вероятных причин этого явления может заключаться в снижении значения pK и, следовательно, в устойчивости альдимина аротиналя (III) с ϵ -аминогруппой Lys^{216} из-за электронодонорного эффекта ароматической системы, сопряженной с альдегидной группой. Другая возможная трактовка этого феномена — возникновение значительных стерических трудностей при переходе из нековалентного комплекса в соответствующий пигмент. Первый эффект исключается для случая сопряжения полиеновой цепи с альдегидной группой через моноеновый цикл. Поэтому цель настоящей работы состояла в сравнении свойств продуктов взаимодействия бактериоопсина с неизомеризующимися относительно C13=C14-связи полиеналами, содержащими циклический фрагмент разного размера (в частности, с аналогами 13-*цис*-ретинала, содержащими в своем составе циклопентеновое (I) или циклогексеновое (IV) кольцо в полиеновой цепи).

Для синтеза аналогов 13-*цис*-ретинала (I, IV) с фиксированной конфигурацией полиеновой цепи мы применили 9-(2-пропинил)- β -ионол (V), который получали с высоким выходом в результате взаимодействия β -ионона с пропаргилмагнийбромидом по известному методу [7]. Конденсация реактива Йодича (см. схему), приготовленного из карбинола (V) и этилмагнийбромид в эфире, с доступными циклическими β -кетоацеталами (VIa, VIб) [8] привела к диолиам (VIIa, VIIб). Последние восстанавливали $LiAlH_4$ в кипящем THF до *транс*-диолов (VIIIa, VIIIб), которые подвергали дегидратации с одновременным удалением ацетальной защиты в ацетоне в присутствии каталитических количеств HBr , получая целевые альдегиды (I, IV). Основной недостаток такого способа синтеза альдегидов (I, IV) обусловлен высокой лабильностью промежуточных диолацеталей (VII, VIII). Например, продукт конденсации (VIIб) был выделен после колоночной хроматографии лишь с выходом 25%, в то время как, по данным ТСХ, реакция протекает значительно полнее. Аналогичные потери наблюдались и при выделении диола (VIIIб). Следует указать, что при элиминировании HO -группы при C9 образуется преимущественно $-C=C$ -связь с *транс*-конфигурацией. Соотношение *транс*/*цис*-изомеров, согласно ВЭЖХ, составляло 4:1 соответственно (см. рис. 1) как для циклогексенового (IV), так и для циклопентенового (I) аналогов.

Циклопентеновый аналог (I) синтезирован аналогичным образом. Детально отработанные условия проведения отдельных стадий и методы хроматографического контроля за их протеканием позволили осуществить синтез альдегида (I) без выделения промежуточных соединений (VIIa, VIIIa). Такой прием обусловлен не только лабильностью диолацеталей (VIIa, VIIIa), но и существенным различием полярности целевого соединения (I) и побочных продуктов. Действительно, хроматографическим разделением суммарного продукта удалось выделить альдегид (I) в индивидуальном состоянии, причем эффективность такого варианта синтеза оказалась в 2 раза выше, чем при выделении промежуточных соединений (VII,



VIII). Структура диолацеталей (VIIa, б, VIIIa, б) подтверждена данными ИК- и УФ-спектров. Целевые аналоги 13-*цис*-ретиная (I, IV) и соответствующие 9-*цис*-изомеры, обладающие большей полярностью, выделены из изомерной смеси полупрепаративной ВЭЖХ. Стереохимическое отнесение полученных изомеров осуществлено сравнением их ^1H -ЯМР-спектров со спектрами соответствующих изомеров ретиная [9] (рис. 2).

Взаимодействием с *n*-бутиламином альдегиды (I, IV) были превращены в соответствующие альдимины, обычно применяемые как сравнительные модели хромофорного центра бактериородопсина (таблица). Реакцию проводили с избытком амина в метаноле в присутствии молекулярных сит 3 \AA . Было показано, что r_K для данных альдиминов не отличаются от r_K полностью-*транс*-ретинолиденбутиламина (r_K 6,56 в 20 М метаноле) [6].

Затем была исследована реакция рекомбинации бактериоопсина с альдегидами (I, IV). При инкубации апомембран с циклопентеновым аналогом (I) менее чем за 1 мин наблюдали его переход в нековалентный комплекс, причем полное завершение формирования тонкой структуры последнего заканчивалось за 5 мин (λ_{max} 370, 395, 420, 440 нм), а через 30 мин происходило его более медленное, чем для 13-*цис*-ретиная, превращение в пурпурный комплекс с λ_{max} 548 нм (рис. 3). Полное завершение регенерации при 20°C — около 3 сут (ср. с [2]).

Поведение циклогексенового аналога (IV) было принципиально иным (рис. 3). Его взаимодействие с бактериоопсином как при 20, так и при 40°C приводило

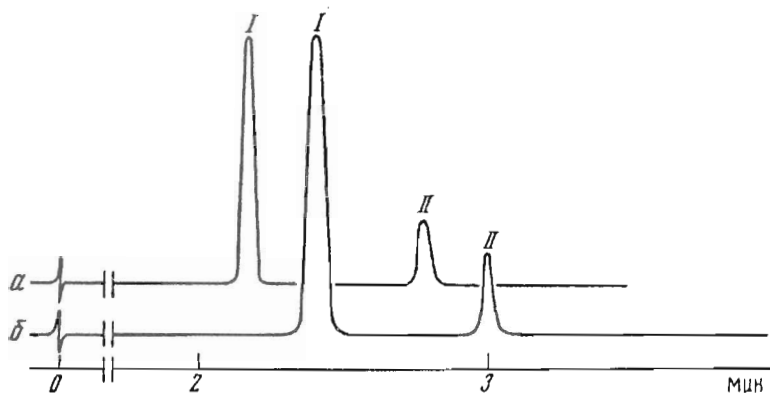


Рис. 1. Состав реакционной массы при получении альдегида (I) из диола (VIIIa) дегидратацией HBr (a) и альдегида (IV) из диола (VIIIб) дегидратацией HBr (б). Колонка Separon SGX (3,3 × 300 мм). Элюент — 10% эфира в гептане, скорость элюента 2 мл/мин, УФ-детектор Клауер (ФРГ). I — 9-транс-, II — 9-цис-изомеры

к образованию желтого комплекса с тонкой структурой спектра поглощения (λ_{\max} 370, 395, 415 нм) без последующего батохромного сдвига. Наблюдаемую реакцию альдегида (IV) с бактериоопсином можно интерпретировать как образование либо нековалентного комплекса, либо аналога интермедиата M412 фотоцикла бактериородопсина, содержащего депротонированный альдимин ретиналя в 13-цис-конфигурации [10]. Выбор между двумя возможными трактовками зафиксированного нами явления был сделан на основании следующих данных.

Известно, что различные продукты взаимодействия аналогов с бактериоопсином имеют различные спектральные характеристики. Так, в спектрах кругового дихроизма (КД мембранные препараты с протонированной хромофорной группой характеризуются длинноволновым положительным и коротковолновым отрицательным максимумами [1, 10, 11] в отличие от нековалентных комплексов, которые имеют один положительный максимум [1, 11]. При анализе полученного нами КД-спектра продукта, полученного на основе циклопентенового аналога (I), четко прослеживаются положительный и отрицательный максимумы, что однозначно свидетельствует об образовании протонированной альдиминной связи. С другой стороны, формы КД-спектров продукта взаимодействия с апомембранами циклогексенового аналога (IV) и нековалентного комплекса циклопентенового аналога (I) близки (ср. [2, 11]).

Последующие эксперименты заключались в вытеснении аналога из комплекса с бактериоопсином. Известно, что ионы Ag^+ в концентрациях 0,5—1 мМ мгновенно разрушают нековалентные комплексы аналогов ретиналя (например, кетона C_{18} или ретинола) с бактериоопсином в присутствии неионного детергента Тритон-X-100 [12]. Используя указанный тест, мы установили, что добавление детергента в концентрации 0,05% вызвало частичное разрушение комплекса полиеналя (IV) с бактериоопсином, а последующее добавление $AgNO_3$ к данным препаратам приводило к мгновенному разрушению остатков комплексов, тогда как для пигмента, образованного циклопентеновым аналогом (I), такого явления не наблюдалось.

Мы проводили осеменение продуктов взаимодействия неизомеризующихся полиеналей (I, IV) с бактериоопсином. В случае циклогексенового аналога (IV) действие света не вызывало никаких спектральных изменений. При длительном освещении (порядка нескольких часов) полиеналя (I) наблюдалось образование продукта с λ_{\max} 420 нм (рис. 4), причем пик имел тонкую структуру, подобную нековалентному комплексу. При помещении образца в темноту происходил возврат к исходному пигменту за время, соответствующее периоду образования ковалентного комплекса альдегида (I) с бактериоопсином (около 70 ч при 20° С).

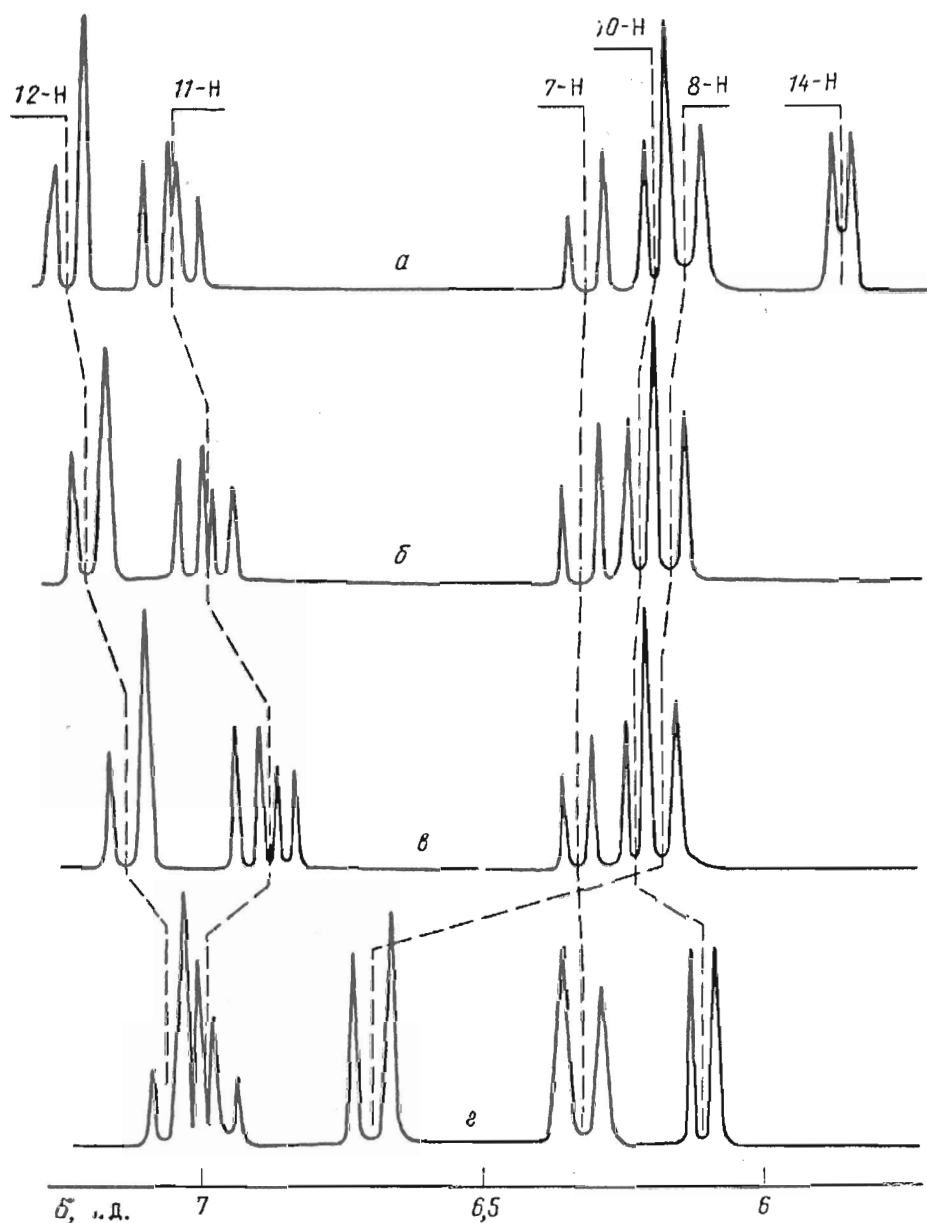


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектры (область олефиновых протонов): 13-*цис*-ретиная (а), «13-*цис*»-циклогексенового аналога (IV) (б), «13-*цис*»-циклопентенового аналога (I) (в), «9, 13-*ди-цис*»-циклопентенового аналога (г)

Для выяснения вопроса, вызывает ли действие света на пигмент депротонирование альдиминной связи или же наблюдается фотоиндуцированный гидролиз альдимины и образуется нековалентный комплекс аналога (I) с бактериоопсином, мы проводили эксперименты по вытеснению *полностью-транс*-ретиналом циклопентенового аналога (I) из всех вышперечисленных форм (пигмента, нековалентного комплекса, пигмента после 4-часового действия света) (рис. 5, б). Как видно из рис. 5а, при добавлении даже значительного избытка ретиная вытеснения аналога (I) из его пурпурного комплекса не происходит. Об этом свидетельствует неизменность максимума поглощения препарата (548 нм как до, так и после добавления ретиная). Увеличение поглощения во всем измеряемом диапазоне

Свойства аналогов ретиналя (I), (II), их альдиминов с *n*-бутиламином и продуктов взаимодействия с бактериоопсином

Соединение	λ_{max} , нм					рК модельного альдимина в 20 М метаноле
	альдегид	альдимин		нековалентный комплекс	хромопротеид	
		основание	сопряженная кислота			
(I)	376	360	442	370 395 420 440	548	6,56
(IV)	370	356	439	370 395 415 430	—	6,52

Примечание. «-» — отсутствие у аналога (IV) способности образовывать пигмент. У пигмента, образованного аналогом (I), отсутствует способность к транспорту протонов и фотоциклу.

длин волн связано с ростом мутности и поглощением самого ретиналя. Принципиально иная ситуация возникает после действия света, вызывающего переход пурпурного комплекса аналога (I) в желтый. В результате прибавления ретиналя к последнему (рис. 5в), как и к апомембранам (рис. 5б), образуется бактериородопсин с максимумом поглощения 560 нм (препарат адаптирован к темноте за время эксперимента). При сравнении скорости взаимодействия (рис. 6) ретиналя с разными формами, образованными циклопентеновым аналогом (I) и бактериоопсином, видно, что добавление *полностью-транс*-ретиналя к нековалентному комплексу аналога (I) приводит к постепенному вытеснению ретиналем аналога (I) из комплекса, причем образование бактериородопсина существенно замедлено, что указывает на способность полиеналя (I) ингибировать ресинтез бактериородопсина. В случае же прибавления ретиналя к желтому комплексу, полученному после действия света, вызывающего переход пурпурного комплекса аналога (I), была получена кинетическая кривая, представляющая собой суперпозицию кривых, характеризующих взаимодействие ретиналя с нековалентным комплексом (участок А) и ковалентным комплексом (участок Б), образованными циклопентеновым аналогом (I).

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы: 1) циклопентеновый аналог (I) в темноте образует прочную альдиминную связь с аминогруппой и практически не вытесняется ретиналем или вытесняется очень медленно, 2) при действии света на этот аналог образуется нековалентный комплекс. Таким образом, исходя из полученных нами данных следует предполагать, что в районе C13=C14-связи имеются исключительно жесткие стерические затруднения, накладываемые белковой матрицей на хромофорную группу. Проведенный нами компьютерный анализ структуры синтезированных альдегидов (I, IV) указывает на крайне незначительное различие в объемах встроенных в полиеновую цепь циклов, причем максимальная разница между циклопентеновым и циклогексеновым кольцами составляет 1,5 Å (см. рис. 7).

Экспериментальная часть

ИК-спектры веществ в пленках сняты на приборе Shimadzu IR-435 (Япония), УФ-спектры метанольных растворов низкомолекулярных соединений и мембранных препаратов — на спектрофотометрах Shimadzu UV-240 (Япония).

Спектры КД получены на дихрографе Mark III (Jobin Ivon, Франция) при 23° С с исключением спектров апомембран.

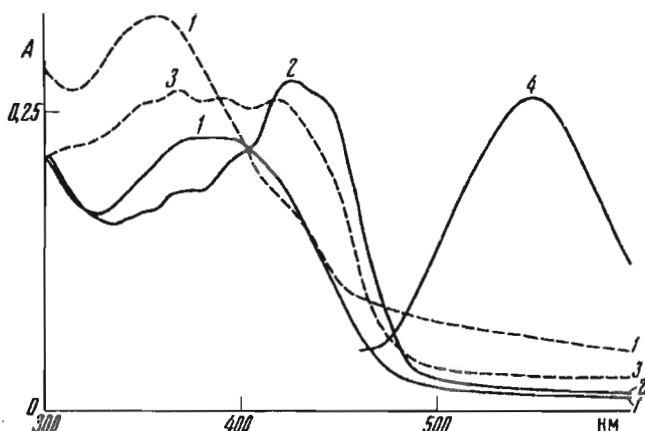


Рис. 3. Взаимодействие альдегидов (I) (сплошные линии) и (IV) (штриховые линии) с бактериоопсином. Запись проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-240 против апомембран через 1 (1), 6 мин (2) и через 4 (3), 24 ч (4). Молярное отношение бактериоопсин — альдегид 1 : 2

Спектры ^1H -ЯМР-растворов в дейтерохлороформе регистрировали на спектрометре WM-250 (Bruker, ФРГ). Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м. д.) относительно внутреннего стандарта (гексаметилдисилоксана, δ 0,055 м. д.), а значения констант спин-спинового взаимодействия — в герцах. При описании спектров приняты следующие сокращения: с.— сильная, ср.— средняя, сл.— слабая, ш.— широкая, с — синглет, д — дублет, т — триплет, кв — квартет, м — мультиплет.

Масс-спектры получены на приборе Varian MAT CN-6.

Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) или Silufol (Kavalier, ЧСФР) в системах растворителей: гексан — эфир, 1 : 1 (А), 4 : 1 (Б), обнаружение пятен — концентрированной серной кислотой, а также в УФ-свете. Адсорбционную колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 100/160 мкм (Chemapol, ЧСФР) и окиси алюминия IV степени активности по Брокману (Reanal, Венгрия). Хроматографическое разделение выполняли на жидкостных хроматографах Knauer (ФРГ) и Kova (ЧСФР), снабженных спектрофотометрическим детектором, обрабатывая результаты с помощью интегратора CR-3A (Shimadzu, Япония). Аналитическую ВЭЖХ проводили на нормально-фазовой колонке Separon SGX (7 мкм, 3,3 × 300 мм), элюент — эфир — насыщенный водой гептан (1 : 9; 2 мл/мин), детекция по поглощению при 290 и 365 нм. Для полупрепаративных целей применяли колонку LiChrosorb Si60 (7 мкм, 10 × 250 мм); элюент — эфир — насыщенный водой гексан (1 : 9; 10 мл/мин).

В работе использовали реактивы и препараты марки х. ч. и ч. д. а. производства СССР, а также β -циклодекстрин (Reanal, Венгрия), MES (2-N-морфолинэтансульфоновая кислота; Sigma, США), гидроксилламин (Fluka, Швейцария), диализный шланг (Serva, ФРГ). 1-(Диэтоксиметил)-2-циклопентанон и 1-(диэтоксиметил)-2-циклогексанон синтезировали по методу [8]. Все операции с реагентами, чувствительными к влаге и кислороду, проводили в тщательно высушенной аппаратуре в атмосфере сухого аргона. Растворители удаляли на вакуумном роторном испарителе при температуре не выше 35° С. С аналогами ретиналя работали при красном свете.

Выделение пурпурных мембран [13, 14] и получение апомембран [14, 15] проводили по известным методикам, в специально указанных случаях дополнительно обрабатывали апомембраны β -циклодекстрином для удаления оксима [16]. Полученные апомембраны суспендировали в среде, содержащей 5 мМ MES и 1 мМ EDTA, pH 6,0. В этой же среде проводили их реакцию с полиеналями, добавляя последние в этанольном растворе (менее 0,5% по объему), а также спектральные измерения.

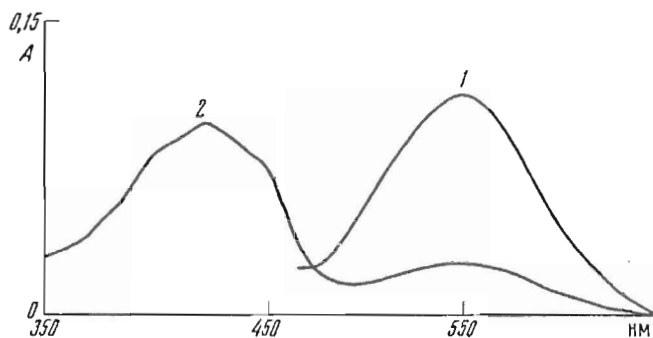


Рис. 4. Действие света на пурпурный комплекс альдегида (I): 1 — исходный спектр пигмента, 2 — спектр после 5-часового освещения пигмента. Спектры поглощения сняты при 20° С против апомембран

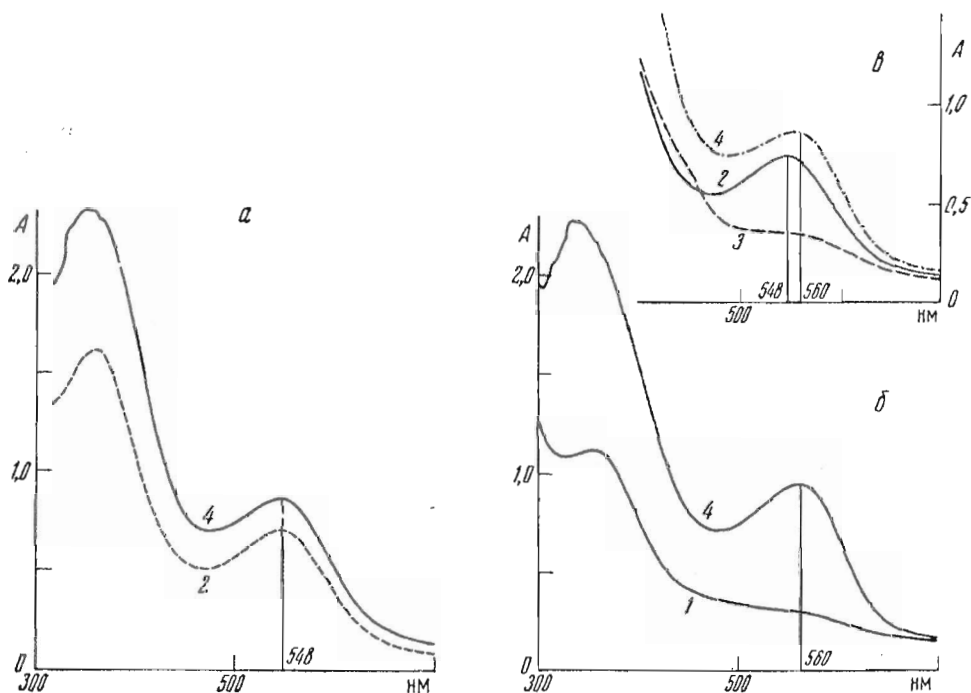


Рис. 5. Взаимодействие полностью-транс-ретиная с комплексами, образованными аналогом (I) с бактериоопсином (а, в), а также с исходными апомембранами (б). Спектры поглощения сняты при 20° С против среды инкубации. 1 — апомембраны; 2 — пурпурный комплекс (преинкубация при 5°С бактериоопсина с аналогом (I), молярное отношение 1 : 1,5 в течение 15 сут в темноте); 3 — на препарат (II) светили 4 ч; 4 — к образцам 2а, 3в и 1б при 20° С добавлен полностью-транс-ретиная с 3-кратным молярным избытком по отношению к апобелку за 30 мин до регистрации спектров поглощения без дополнительного освещения образцов

Для освещения суспензии мембранных препаратов использовали свет 500-Вт галогенной лампы, последовательно пропущенный через водные растворы CuSO_4 и K_2CrO_4 [17].

Молекулярное моделирование аналогов ретиная проводили с использованием программы «Alchemy II» (TRIPOS Associates St. Louis, Mo, Sigma, версия для IBM PC).

9-(2-Пропинил)- β -ионол (V). К суспензии 1,3 г активированной магниевой стружки и 1,0 г HgCl_2 в 40 мл абс. эфира прибавляли при перемешивании 6,2 г пропаргилбромида, а через 30 мин раствор 2,0 г β -ионона в 10 мл эфира. Через 45 мин реакционную массу разлагали насыщенным раствором NH_4Cl , трижды

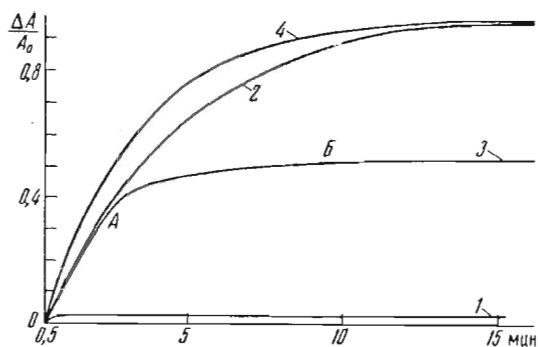


Рис. 6. Скорость взаимодействия полностью-*транс*-ретинала с различными мембранными препаратами аналогов бактериородопсина, сформированными на основе циклопентенового аналога (I) (условия см. рис. 5): 1 — пигмент с λ_{\max} 548 нм (преинкубация бактериоопсина с аналогом (I)); 2 — нековалентный комплекс с λ_{\max} 420 нм (преинкубация бактериоопсина с аналогом (I), молярное отношение 1 : 1,5 при 20° С в течение 30 мин в темноте); 3 — препарат, полученный после освещения пигмента в течение 4 ч галогенной лампой 500 Вт, светофильтры — растворы CuSO_4 и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 4 — контроль: взаимодействие полностью-*транс*-ретинала с апомембранами. A_0 — поглощение суспензии через 0,5 мин после добавления ретинала; $\Delta A = A_t - A_0$, где A_t — поглощение суспензии в момент, указанный на оси абсцисс. Участки А и В — см. текст

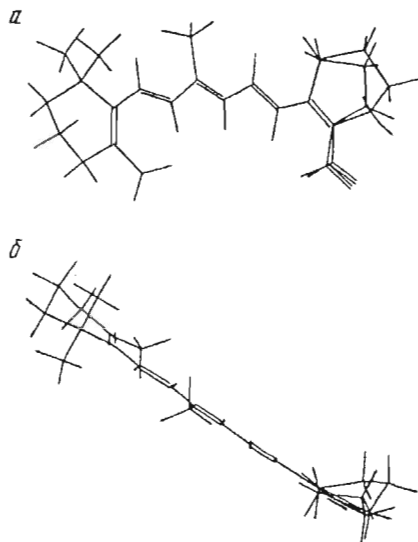


Рис. 7. Молекулярные модели аналогов (I) и (II), полученные с использованием программы «Аchemy II» (версия для IBM PC). Приведены проекции на плоскость, параллельную (а) и перпендикулярную (б) плоскости полиеновой цепи

экстрагировали эфиром, объединенный органический слой промывали последовательно водой и насыщенным раствором NaCl , сушили Na_2SO_4 , растворители удаляли и остаток наносили на колонку (35×150 мм) с силикагелем. Колонку промывали последовательно 150 мл гексана и 200 мл смеси эфир — гексан, 15 : 85 (по объему). Фракции, содержащие карбинол (V), объединяли, растворитель удаляли. Выход карбинола (V) 1,6 г (90%). ИК-спектр (жленка, ν , см^{-1}): 3400 ш. ($-\text{OH}$), 2115 сл. ($-\text{C}\equiv\text{C}-$). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 6,20 (1H, д, J 16,0, 7-H), 5,50 (1H, д, J 16,0, 8-H), 2,45 (2H, д, J 2,5, 10- CH_2), 2,35 (1H, с, OH), 2,05 (1H, т, J 2,5, $\equiv\text{C}-\text{H}$), 1,80 (2H, т, J 6,0, 4- CH_2), 1,68 (3H, с, 9- CH_3), 1,51 (2H, м, 3- CH_2), 1,40 (2H, м, 2- CH_2), 1,35 (3H, с, 5- CH_3), 0,97 (6H, с, 1- $(\text{CH}_3)_2$) [7].

1,1,3-Триметил-2-[3-метил-3-гидрокси-6-(1-гидрокси-2-(диэтоксиметил)циклогексил)гекс-1-ен-5-инил]циклогекс-2-ен (VIIб). К раствору 4,4 г ацетиленового спирта (V) в 50 мл абс. эфира при перемешивании в атмосфере аргона и при кипении прибавляли 37,2 ммоль раствора этилмагнийбромид в эфире за 30 мин, реакционную смесь нагревали при кипении 2 ч, охлаждали до 0° С и прибавляли раствор 7,5 г кетоацетала (VIб) в 15 мл эфира. Затем реакционную смесь выдерживали 16 ч при 3° С и разлагали насыщенным раствором NH_4Cl , экстрагировали эфиром (3×50 мл), объединенный эфирный экстракт промывали последовательно водой, насыщенным раствором NaCl , сушили над Na_2SO_4 . Остаток, полученный после удаления растворителей, хроматографировали на колонке (30×500 мм) с силикагелем при элюировании линейным градиентом гексан — эфир до 30% последнего (общий объем элюента 1 л). Выход ацетала (VIIб) 1,98 г (25%), масло, R_f 0,4 (A). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3400 ср. ($-\text{OH}$), 2250 сл. ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), 1180—980 ш. ($-\text{CH}(\text{OEt})_2$).

1,1,3-Триметил-2-[3-метил-3-гидрокси-6-(1-гидрокси-2-(диэтоксиметил)циклогексил)гекс-1,5-диен]циклогекс-2-ен (VIIIб). К раствору 1,16 г диолина (XI) в 30 мл тетрагидрофурана добавляли 0,23 г LiAlH_4 и нагревали при кипении в атмосфере аргона 2 ч. Реакционную смесь разлагали насыщенным раствором NH_4Cl , экстрагировали эфиром (3×30 мл), объединенный органический экстракт

промывали последовательно водой и насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄, растворители удаляли и остаток хроматографировали на колонке (20 × 500 мм) с силикагелем, элюируя вещество смесью гексан — эфир, 10 : 1. Выход ацеталя (VIIIб) 0,383 г (32%), масло, R_f 0,3 (А). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3400 ср. (—ОН), 1600 сл. (—C=C—), 1180—980 ш. (—CH(OEt₂)).

1,1,3-Триметил-2-[3-метил-6-(2-формилциклогекс-1-ен)гекс-1,5-триенил]-циклогекс-2-ен (IV). К раствору 200 мг диола (VIIIб) в 10 мл ацетона прибавляли 5 мкл воды и нагревали при кипении в атмосфере аргона 10 мин, после чего добавляли 5 мкл 48% HBr. Через 5 мин реакцию массу обрабатывали 0,5 мл насыщенного раствора NaHCO₃ и растворитель удаляли. Остаток хроматографировали на колонке (10 × 300 мм) с окисью алюминия, элюируя вещество смесью гексан — эфир, 4 : 1. Фракции, содержащие смесь соединений с R_f 0,6—0,7 (Б), после удаления растворителя разделяли с помощью полупрепаративной ВЭЖХ. Выход альдегида (IV) 147 мг (95%), соотношение 9-транс- и 9-цис-изомеров 4 : 1, R_f 0,64 (Б) и 0,61 соответственно.

9-транс-Изомер. УФ-спектр, λ_{max}, нм (ε): 370 (42 000). ¹H-ЯМР-спектр (δ, м.д.): 10,38 (1H, с, —CHO), 7,26 (1H, д, J 15,0, 12-H), 6,92 (1H, дд, J 11,5, 15,0, 11-H), 6,28 (1H, д, J 15,5, 7-H), 6,18 (1H, д, J 15,5, 8-H), 6,08 (1H, д, J 11,5, 10-H), 2,51 (2H, м, 1'-CH₂), 2,32 (2H, м, 4'-CH₂), 2,02 (2H, т, J 6,3, 4-CH₂), 1,99 (3H, с, 9-CH₃), 1,72 (3H, с, 5-CH₃), 1,61 (6H, м, 3-CH₂, 2'-CH₂, 3'-CH₂), 1,02 (6H, с, 1-(CH₃)₂).

Масс-спектр (m/z): 324 (M⁺), C₂₃H₃₂O.

9-цис-Изомер. ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 10,37 (1H, с, CHO), 7,18 (1H, д, J 15,5, 12-H), 6,99 (1H, дд, J 11,0, 15,5, 11-H), 6,63 (1H, д, J 16,0, 8-H), 6,27 (1H, д, J 16,0, 7-H), 6,09 (1H, д, J 11,0, 10-H), 2,48 (2H, т, J 7,5, 1'-CH₂), 2,32 (2H, т, J 7,5, 4'-CH₂), 2,06 (2H, т, J 7,5, 4-CH₂), 2,00 (3H, с, 9-CH₃), 1,74 (3H, с, 5-CH₃), 1,73 (4H, с, 2'-CH₂, 3'-CH₂), 1,62 (2H, м, 3-CH₂), 1,47 (2H, м, 2-CH₂), 1,03 (6H, с, 1-(CH₃)₂).

1,1,3-Триметил-2-[3-метил-6-(2-формилциклопент-1-ен)гекс-1,5-триенил]-циклогекс-2-ен (I). К раствору 3,41 г ацетиленового спирта (IV) в 50 мл абс. эфира при перемешивании и кипении прибавляли 40 ммоль раствора этилмагнийбромид в эфире, реакцию смесь нагревали при кипении 5 ч, охлаждали до 0° С и прибавляли раствор 4 г кетоацеталя (VIa) в 15 мл эфира. Затем реакцию смесь выдерживали 16 ч при 3° С и разлагали насыщенным раствором NH₄Cl, экстрагировали трижды эфиром, объединенный эфирный слой промывали последовательно водой и насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄. Остаток, полученный после удаления растворителей, растворяли в 50 мл тетрагидрофурана и прибавляли 0,5 г LiAlH₄, после чего нагревали при кипении 3 ч, а затем добавляли насыщенный раствор NH₄Cl, трижды экстрагировали эфиром, объединенный органический слой промывали последовательно водой и насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄, растворители удаляли. Остаток растворяли в 50 мл ацетона, добавляли 45 мкл воды и после 10 мин кипячения прибавляли 50 мкл 48% HBr. Через 5 мин реакцию массу обрабатывали 0,5 мл насыщенного раствора NaHCO₃ и растворитель удаляли. Полученный остаток растворяли в гексане и хроматографировали на колонке (10 × 300 мм) с окисью алюминия, элюируя вещество смесью гексан — эфир, 4 : 1. Фракции, содержащие смесь соединений с R_f 0,55—0,65 (Б), после удаления растворителя разделяли с помощью полупрепаративной ВЭЖХ. Выход альдегида (I) 0,66 г (15%), соотношение 9-транс- и 9-цис-изомеров 4 : 1, R_f 0,58 (Б) и 0,55 соответственно.

9-транс-Изомер. УФ-спектр, λ_{max}, нм (ε): 376 (42 000). ¹H-ЯМР-спектр (δ, м.д.): 10,22 (1H, с, CHO), 7,13 (1H, д, J 16,0, 12-H), 6,88 (1H, дд, J 11,0, 16,0, 11-H), 6,33 (1H, д, J 16,0, 7-H), 6,20 (1H, д, J 11,0, 10-H), 6,15 (1H, д, J 16,0, 8-H), 2,83 (2H, т, J 7,5, 1'-CH₂), 2,67 (2H, т, J 7,5, 2'-CH₂), 2,04 (2H, т, J 7,5, 4-CH₂), 2,00 (3H, с, 9-CH₃), 1,92 (2H, м, 3'-CH₂), 1,71 (3H, с, 5-CH₃), 1,61 (2H, м, 3-CH₂), 1,46 (2H, м, 2-CH₂), 1,03 (6H, с, 1-(CH₃)₂).

Масс-спектр (m/z): 310 (M^+), $C_{22}H_{30}O$.

9-*цис*-Изомер. 1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 10,21 (1H, с, CHO), 7,07 (1H, д, J 15,0, 12-H), 6,96 (1H, дл, J 10,0, 15,0, 11-H), 6,63 (1H, д, J 16,0, 8-H), 6,30 (1H, д, J 16,0, 7-H), 6,11 (1H, д, J 10,0, 10-H), 2,83 (2H, т, J 7,5, 1'-CH₂), 2,67 (2H, т, J 7,5, 2'-CH₂), 2,06 (2H, т, J 7,5, 4-CH₂), 2,01 (3H, с, 9-CH₃), 1,90 (2H, м, 3'-CH₂), 1,74 (3H, с, 5-CH₃), 1,63 (2H, м, 3-CH₂), 1,48 (2H, м, 2-CH₂), 1,04 (6H, с, 1-(CH₃)₂).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stockenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A.//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 505. № 3—4. P. 215—278.
2. Lang J. M., Carriker J. D., Balogh-Nair V., Nakanishi K.//J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 15. P. 5162—5164.
3. Мицнер Б. И., Ходонов А. А., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 5—53.
4. Sheves M., Friedman N., Albeck A., Ottolenghi M.// Biochemistry. 1985. V. 24. № 5. P. 1260—1265.
5. Albeck A., Friedman N., Sheves M., Ottolenghi M.//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 4614—4618.
6. Еремин С. В., Мицнер Б. И., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.//Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1116—1124.
7. Broeck A. D., Lugtenburg J.//Recueil trav. chim. 1980. V. 99. № 11. P. 363—366.
8. Макин С. М., Кругликова Р. И., Попова Т. П., Тагиров Т. К.//Журн. орган. химии. 1981. Т. 17. № 47. С. 723—727.
9. Liu R. S. H., Asato A. E.//Tetrahedron. 1984. V. 40. № 11. P. 1931—1969.
10. Draheim J. E., Cassim J. Y.//Biophys. J. 1985. V. 47. P. 497—507.
11. Becher V., Cassim J. Y.//Biophys. J. 1976. V. 16. P. 1183—1200.
12. Родионов А. В., Шкроб А. М.//Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 3. С. 376—394.
13. Oesterheld D., Stoerkenius W.//Meth. Enzymol. 1982. V. 88. P. 349—355.
14. Драчев А. Л., Зорина В. В., Мицнер Б. И., Хитрина Л. В., Ходонов А. А., Чекулаева Л. Н.//Биохимия. 1987. Т. 2. № 9. С. 1559—1569.
15. Dencher N. A., Rafferty C. N., Sperling W.//Ber. Kerhforsch. Julich. 1976. № 1347. S. 1—42.
16. Мицнер Б. И., Варга М., Швец В. И., Хитрина Л. В., Драчев Л. А., Скулачев В. П., Данишина С. В., Чекулаева Л. Н.//Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 2. С. 135—137.
17. Драчев А. Л., Драчев Л. А., Евстигнеева Р. П., Каулен А. Д., Лазарова Ц. Р., Лайхтер А. Л., Мицнер Б. И., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н.//Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 11. С. 1125—1142.

Поступила в редакцию
22.1.1993

Yu. G. Kirillova, S. V. Eremin, L. V. Khitrina*, B. I. Mitsner

CYCLOPENTENE AND CYCLOHEXENE RETINAL ANALOGUES REACT DIFFERENTLY WITH BACTERIOOPSIN

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
* A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow

Cyclopentene and cyclohexene analogues of 13-*cis*-retinal were synthesized by the Iotsich condensation of 9-propynyl- β -ionol with the corresponding cyclo- β -ketoacetals. In the bacteriorhodopsin resynthesis test these analogues reacted with bacterioopsin in *Halobacterium halobium* apomembrane, the cyclopentene 13-*cis*-retinal analogue forming the corresponding bacteriorhodopsin analogue that can undergo photoinduced hydrolysis. Interaction of the cyclohexene 13-*cis*-retinal analogue with bacterioopsin stops at the stage of the non-covalent complex formation.