



УДК 547.381:577.161.1:591.484.6

ОКСИМЫ РЕТИНАЛЕЙ

Соколова Н. А., Мицнер Б. И., Горина Н. Ю.,
Евстигнева Р. П.

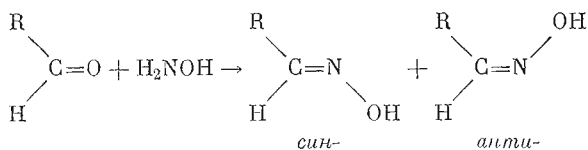
Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова

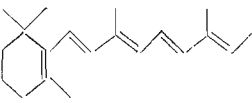
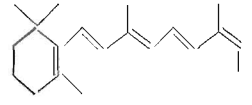
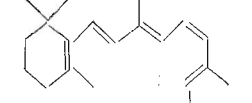
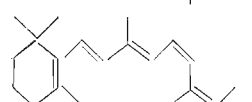
Исходя из *полностью-Е-*, 11Z-, 13Z-, 11Z, 13Z-ретиналей синтезированы соответствующие *син-* и *анти-*формы ретинилиденоксимов. Отнесение сделано на основании спектральных данных. Установлена большая термодинамическая устойчивость *син-* изомеров ретинилиденоксимов в этом ряду соединений.

Светочувствительные пигменты, объединяемые в общий класс ретинилиденпротеидов — родопсин, ретинохром, бактериородопсин, — несмотря на существенные функциональные различия, имеют некоторые общие свойства. Так, все они типичные мембранные белки. Общим для них является наличие стехиометрического соотношения хромофора и белка, равного 1 : 1, образование шиффового основания между соответствующим изомером ретиналя и ϵ -аминогруппой одного из остатков лизина, «красный сдвиг» полосы поглощения хромофора и ряд других свойств. Такое сходство диктует и общность методов, используемых для изучения строения и функции этих белков. В частности, для определения структуры хромофорной части исследуемого ретинилиденпротеида чаще всего используют реакцию последнего с гидросиламином. Такой подход вполне оправдан, так как при этом исключается изомеризация хромофора в процессе реакции; кроме того, образующиеся оксимы характеризуются большей стабильностью и имеют большие различия в хроматографической подвижности по сравнению с соответствующими ретиналями. Таким путем было установлено или подтверждено, что *полностью-Е-* ретиналь является хромофорной группой бактериородопсина [1] и ретинохрома кальмара [2], его 13Z-изомер входит в состав темновой формы бактериородопсина [1], а 11Z-ретиналь служит единственной хромофорной группой зрительных пигментов — родопсинов [3].

Следует, однако, отметить, что сведения о структуре и физико-химических характеристиках изомеров ретинилиденоксимов весьма ограничены. Упоминание о *син-анти-*изомерии в этом ряду соединений приводится лишь в некоторых исследованиях, посвященных бактериородопсину [1, 4, 5], однако без каких бы то ни было попыток установления *син-* и *анти-*структур найденных изомеров. В более ранних синтетических работах [6, 7] возможность существования *син-* и *анти-*форм не рассматривается. По-видимому, описанные *полностью-Е-*, 13 Z-, 11 Z- и 9Z-ретинилиденоксимы [6, 7] представляли собой смесь *син-* и *анти-*форм. По существу единственное строгое отнесение к *син-*, *анти-*ряду было осуществ-

Физико-химические характеристики ретинилиденоксимов



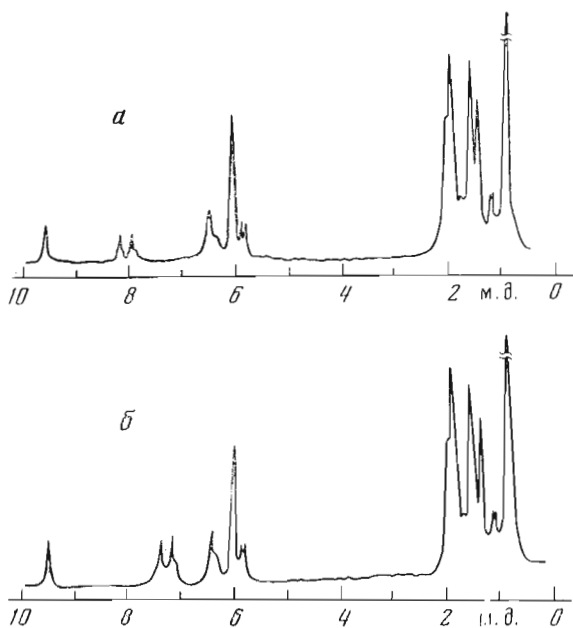
Соединение	Ряд	R	Конфигурация опсиа	Соотношение <i>син</i> -: <i>анти</i> -форм	Т. пл. (пентан), °С	R _f	λ _{макс} , нм (ε · 10 ⁻³)	δ _{макс} , Д (ν ₁₁₋₁₅ 10 Гц)
(Iа) (Iб)	<i>полностью-E</i>		<i>син-анти-</i>	2,3	142–144 144–146	0,58 0,38	357 (55,5) 360 (56,6)	7,95 7,3
(IIа) (IIб)	13Z-		<i>син-анти-</i>	8,0	110–112 116–117	0,55 0,52	353 (44,8), 256 (1,17) 357 (55,5), 256 (10,7)	8,0 7,35
(IIIа) (IIIб)	11Z-		<i>син-анти-</i>	2,5		0,64 0,48	350 (23,0), 256 (5,18) 353 (25,4), 256 (8,75)	7,78 7,17
(IV)	11Z, 13Z-		<i>син-</i>	—		0,59	338 (27,0), 256 (17,6)	6,21

лено только Де Линхейером с сотр. [8] для *полностью-E*-ретинилиденметоксимов. Следует также заметить, что исследования стереохимии ретинилиденоксимов представляют особый интерес в связи с их высокой биологической активностью [9].

Нами осуществлен синтез и выделение в индивидуальном состоянии семи изомерных ретинилиденоксимов: *син*- и *анти*-форм оксимов *полностью-E*-, 13 Z- и 11Z-ретиналей (I — III, а, б) и *син*-11 Z, 13 Z-ретинилиденоксида (IV) (см. таблицу). Оксимы получены по стандартному методу — действием 10-кратного избытка 1 н. водного раствора гидроксилamina на раствор соответствующего изомера ретиналя в спирте [7]. Образовавшуюся смесь *син*- и *анти*-форм разделяли хроматографически на силикагеле.

На изомерный характер синтезированных пар ретинилиденоксимов (I — III а, б) указывало отсутствие различия в величинах химических сдвигов всех протонов молекулы, кроме протона при C₍₁₅₎ (см., например, рисунок), а также сходство их ИК-спектров. В ИК-спектрах исследованных соединений (I) — (IV) наблюдались характерные полосы поглощения при 1580 см⁻¹ (валентные колебания сопряженной C=N-связи), 3300 — 3250 см⁻¹ (валентные колебания ассоциированной OH-группы), 975 см⁻¹ (*транс*-двойная связь) и имели место лишь небольшие различия в области «отпечатков пальцев». Дополнительное подтверждение изомерного характера синтезированных оксимов было получено из данных масс-спектрометрии на примере *син*- и *анти*-*полностью-E*-ретинилиденоксимов (I а, б). Было найдено различие в относительных интенсивностях молекулярного иона (*m/e* 299) и иона с *m/e* 281 (*M*⁺ — H₂O) для этих изомеров (*I*₂₉₉/*I*₂₈₁ = 1,3 для *анти*-форм и 42,5 для *син*-изомера). Этот факт легко поддается интерпретации, если учесть повышенную склонность *анти*-оксимов к перегруппировке Бекмана по сравнению с *син*-формой.

Окончательное отнесение изомеров к *син*- и *анти*-рядам было сделано на основе данных спектров ПМР. Известно, что сигнал протона при атоме



ПМР-спектры 11*Z*-ретинилиденоксимов: а — *син*-изомер (IIIа), б — *анти*-изомер (III б)

углерода C=N-связи *син*-оксима расположен в более сильном поле по сравнению с сигналом протона *анти*-формы [10,11]. Различие в химических сдвигах протона при C₍₁₅₎ полностью-*E*-ретинилиденметоксимов, как было показано Де Линхейером с сотр. [8], составляет 0,7 м. д.; в случае исследуемых соединений мы наблюдали несколько меньшую величину Δδ, равную 0,6 — 0,65 м. д. Таким образом, на основе этих данных было установлено, что для *син*- и *анти*-пар ретинилиденоксимов (I—III а, б) *син*-ряду соответствуют соединения с большей хроматографической подвижностью (см. таблицу). Это согласуется с приведенными в работах [1, 4, 5] величинами R_f полностью-*E*- и 13*Z*-оксимов.

Данные электронных спектров соединений (I — III а, б) показывают, что *син*-изомеры имеют максимумы поглощения на 3—4 нм в более коротковолновой области, чем соответствующие *анти*-изомеры, как и следовало ожидать, учитывая общую конформацию хромофорной группы. Кроме того, следует отметить, что полностью-*E*-, 13*Z*-, 11*Z*- и 11*Z*-, 13*Z*-ретинилиденоксимы имеют гораздо большие различия в положении максимумов поглощения, чем исходные ретинали, которые, как известно, поглощают при очень близких длинах волн. Это позволяет существенно упростить представляющее в настоящее время определенные трудности установление конформации полиеновой цепи соединений ряда витамина А, используя известные значения λ_{макс} ретинилиденоксимов в сочетании с данными ТСХ.

В отличие от полностью-*E*-, 11*Z*- и 13*Z*-ретиналей реакция гидроксил-амина с 11*Z*-, 13*Z*-изомером протекает с образованием лишь одного 11*Z*-, 13*Z*-оксима (IV). Другой изомер, выделенный из реакционной смеси, по своей хроматографической подвижности, ИК-, УФ- и ПМР-спектрам оказался идентичным *анти*-форме 13*Z*-ретинилиденоксима (II б) (соотношение изомеров 11*Z*-, 13*Z*- — 13*Z*- равно 2,7). 11*Z*-, 13*Z*-Оксим (IV) по сравнению с другими оксимами (I — III а, б) поглощает в наиболее коротковолновой области спектра (338 нм), причем экстинкция минорной *цис*-полосы (256 нм) существенно выше, чем у других изомеров (II — III а, б). Величина R_f при ТСХ для этого вещества оказалась близкой к значению R_f

син-ретинилиденоксимов. Тем не менее данные ИК-, УФ- и ПМР-спектров не позволяют провести точное отнесение соединения (IV) к *син*-ряду. Для доказательства *син*-конфигурации оксима (IV) мы воспользовались известным фактом о легкости изомеризации 11 Z, 13 Z-ретиналя в 13 Z-изомер [12]. Нами было показано, что при нагревании 11 Z, 13Z-оксима (IV) в гексане действительно происходит термоизомеризация 11 Z-связи. Нами установлено на других изомерах оксимов (I — III а, б), что выбранные условия изомеризации не вызывают *син* ↔ *анти*-перехода. Продукт реакции по своим физико-химическим характеристикам был идентичен *син*-13Z-оксиму (IIа), полученному из 13Z-ретиналя.

Следует отметить, что бóльшая термодинамическая устойчивость *син*-ретинилиденоксимов наблюдается также и для остальных исследованных соединений. На это указывают величины соотношения *син*-: *анти*-изомеров (см. таблицу) в реакциях соответствующих ретиналей с гидроксиламином. По-видимому, устойчивость *анти*-изомера ретинилиденоксимов падает в ряду: *полностью-E*- > 11 Z- ≫ 13 Z- > 11 Z, 13 Z-, причем наименее устойчивый *анти*-11Z, 13Z-оксим в процессе реакции изомеризуется в *анти*-13 Z-оксим (II б).

Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на приборе Hitachi EPS-3T (Япония) в метаноле. ИК-спектры получены на спектрофотометре Perkin-Elmer 257 (Англия) в пленке или вазелиновом масле. Спектры ПМР сняты на спектрометре WP-60 (ФРГ) в четыреххлористом углероде при 60 МГц, внутренний стандарт — тетраметилсилан. Масс-спектры получены на масс-спектрометре MX-1309 при энергии ионизирующих электронов 30 эВ и ускоряющем напряжении 2 кВ. Исследуемые образцы вводили непосредственно в ионный источник, температура испарения 70—80°. ТСХ осуществляли на силикагеле Л40/100 μ в системе гексан — эфир (1 : 2) с проявлением парамиода.

Получение оксимов. К раствору 0,5 г соответствующего изомера ретиналя в 50 мл метанола при перемешивании в темноте в атмосфере аргона добавляли 20 мл 1 н. водного раствора гидроксилamina. Через 10 мин реакционную смесь выливали в 50 мл ледяной воды, вещество экстрагировали эфиром. Объединенный эфирный экстракт промывали водой до pH 7, сушили Na₂SO₄ и растворитель удаляли. Остаток наносили на колонку с 20 г силикагеля Л 40/100 μ, элюируя оксими смесью гексан — эфир, 3 : 1. Фракции, содержащие оксими, объединяли и упаривали, остаток кристаллизовали из пентана. Смешанные фракции повторно очищали на колонке с силикагелем Л 40/100 μ (контроль ТСХ). Выход количественный.

Изомеризация син-11 Z, 13 Z-ретинилиденоксима (IV) в син-13 Z-форму (II а). Раствор 0,8 г *син*-11Z, 13Z-оксима (IV) в 40 мл гексана кипятили 40 мин в темноте в атмосфере аргона, реакционную смесь охлаждали, остаток кристаллизовали из пентана. Выход *син*-13Z-изомера (II а) 0,7 г (87,5%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jan L. Y. (1975) Vision Res., 15, 1081—1086.
2. Sperling L., Hubbard R. (1975) J. Gen. Physiol., 65, 235—251.
3. Wald G. (1974) Exp. Eye Res., 18, 333—343.
4. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhman L. (1973) Eur. J. Biochem., 40, 453—463.
5. Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K., Henselman R., Stoeckenius W. (1977) Biochemistry, 16, 1955—1959.
6. Wald G., Brown P. K. (1953) J. Gen. Physiol., 37, 189—192.
7. Farrar K. R., Hamlet J. C., Henbest H. B., Jones E. R. H. (1952) J. Chem. Soc., 2657—2660.
8. De Leenheer A. P., De Ruyter M. G. M. (1975) Anal. Biochem., 63, 169—174.

9. Sporn M. B., Dunlop N. M., Newton D. L., Henderson W. R. (1975) *Nature*, **263**, 110—113.
10. Karabatsos G. J., Taller R. A., Vane F. M. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2327—2332.
11. Karabatsos G. J. (1967) *Tetrahedron*, **23**, 1076—1077.
12. Oroshnik W., Brown P. K., Hubbard R., Wald G. (1956) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **42**, 578—581.

Поступила в редакцию
19.XII.1977

RETINALOXIMES

SOKOLOVA N. A., MITSNER B. I., GORINA N. Y., EVSTIGNEEVA R. P.

M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The corresponding *syn*- and *anti*-retinylideneoximes have been synthesized from all-*E*, 11*Z*-, 13*Z*- and 11*Z*, 13*Z*-retinals. The *syn* and *anti* assignments were arrived at basing on spectral data. In this series *syn*-retinylideneoximes showed greater thermodynamic stability.
