



УДК 577.164.131'546.185

СИНТЕЗ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ДИ- И ТРИФОСФАТОВ

*Львова С. Д., Карнейский А. М., Гунар В. И.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва]*

Осуществлен синтез пиридоксаль-5'-фосфоморфолидата; его конденсацией с солями орто- и пиррофосфорной кислот получены пиридоксаль-5'-дифосфат и пиридоксаль-5'-трифосфат соответственно.

Пиридоксаль-5'-фосфат (I) — кофермент значительного числа ферментов, катализирующих различные превращения аминокислот. В последнее время был проведен ряд работ, где он использован для введения специфической метки в активный центр некоторых ферментов (РНК- и ДНК-полимеразы), субстратами которых являются соединения анионного характера, в частности нуклеозид 5'-ди- и трифосфаты [1, 2]. Представлялось интересным получить и изучить ингибиторные свойства пиридоксаль-5'-ди- и трифосфатов, поскольку сродство этих соединений к активному центру указанных ферментов должно быть выше, чем у соответствующего монофосфата. В связи с этим нами осуществлен синтез пиридоксаль-5'-дифосфата (II) и пиридоксаль-5'-трифосфата (V) и изучены их физико-химические свойства.

Синтез указанных соединений проводили активацией фосфорной группы пиридоксаль-5'-фосфата одним из способов, известных в химии нуклеотидов, и последующей конденсацией активированного производного с органическими солями орто- и пиррофосфорной кислот. Нами изучены имидазольный, фосфодизфирный и морфолидный методы активации. Попытка получить имидазольный пиридоксаль-5'-фосфата взаимодействием последнего с карбонилдиимидазолом привела к образованию смеси веществ, большинство которых не содержало альдегидной группы. Попытка осуществить так называемую обратную активацию, т. е. получить имидазольный фосфорной кислоты и ввести его во взаимодействие с пиридоксаль-5'-фосфатом, также была безуспешной.

Другое активированное производное — дифениловый эфир пиридоксаль-5'-дифосфата (II) мы получали взаимодействием триоктиламмониевой соли монофосфата (I) с дифенилхлорфосфатом в присутствии триэтиламина. Конденсация дифенилового эфира дифосфата (II) с трибутиламмониевой солью ортофосфорной кислоты приводила к образованию соли дифосфата (III). Соединение выделяли из реакционной смеси осаждением в виде кальциевой соли.

Недостатком этого способа является значительное загрязнение Са-соли дифосфата солями фосфорной кислоты, на что указывало низкое зна-

Сокращения: ДЦГК — N,N'-дициклогексилкарбодимид, ДМФА — диметилформамид.

чение коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon_{388}^{\text{pH}7}$ 1300). Попытки очистить соединение пересажением или превращением Са-соли в свободный дифосфат (III) обработкой дауэксом 50W \times 4 (H⁺) и затем в Na-соль действием перхлората натрия не привели к существенному увеличению коэффициента молярной экстинкции.

Наиболее приемлемым для синтеза ди- и трифосфатов пиридоксаль оказался морфолидный метод. Морфолид (IV) получали обработкой пиридоксаль-5'-фосфата морфолином в присутствии двух эквивалентов ДЦГК в хлороформе. Соединение выделяли в виде 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли и его строение доказывали количественным превращением в фосфат (I) путем кислотного гидролиза (0,1 н. HCl, 20°, 10 мин). Взаимодействие морфолида (IV) с трибутиламмониевой солью ортофосфорной кислоты в ДМФА приводило к образованию соли дифосфата (III), которую выделяли из реакционной смеси хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте триэтиламоний-бикарбонатного буфера и последующим осаждением в виде Na-соли или хроматографией на дауэксе 2 \times 10 (Cl⁻) в градиенте хлористого лития и очисткой Li-соли дифосфата многократным пересажением.

Строение дифосфата (III) доказано физико-химическими методами. Его УФ-спектр обнаруживает максимумы поглощения при следующих длинах волн, характерных для фосфорных эфиров пиридоксаль: 325, 383 нм (рН 7, фосфатный буфер), 297 нм (0,1 н. HCl) и 310, 387 нм (0,1 н. NaOH). В его ³¹P-ЯМР-спектре имеется два дублета при 10,59 и 6,77 м. д. с $J_{\text{P-P}}$ 19 Гц, отвечающие β - и α -фосфорным атомам. Кислотный гидролиз дифосфата (1 н. HCl, 100°, 10 мин) приводил к образованию пиридоксаль-5'-фосфата и следов пиридоксаль. При взаимодействии морфолида (IV) с бис-трибутиламмониевой солью пирофосфорной кислоты в ДМФА образовывалась соответствующая соль трифосфата (V). Ее выделяли хроматографией на дауэксе 2 \times 10 (Cl⁻) в градиенте концентрации хлористого лития, гомогенность доказывали ТСХ и электрофорезом, а строение подтверждали данными кислотного гидролиза, УФ-, ¹H-ЯМР- и ³¹P-ЯМР-спектров. Гидролиз трифосфата (V) 1 н. HCl при 100° в течение 10 мин обнаружил образование монофосфата (I) в качестве основного продукта и следов пиридоксаль. УФ-спектры соединения (V) в различных средах имеют полосы поглощения, характерные для фосфорных эфиров пиридоксаль, и совпадают со спектрами дифосфата. В ³¹P-ЯМР-спектре имеются 3 группы сигналов в области 9,0; 12,5 и 23,0 м. д. Сигнал при 9,0 м. д. представляет собой дублет с $J_{\text{P-P}}$ 19,2 Гц, что характерно для γ -атома фосфора трифосфатной группы [3, 4]. Сигнал в области 12,5 м. д. характеризуется двумя константами спин-спинового взаимодействия ($J_{\text{P-P}}$ 19,2 и $J_{\text{P-H}}$ 9,0 Гц) и состоит из 5 явно выраженных линий, что, очевидно, является следствием частичного перекрытия 2 из 6 теоретически ожидаемых линий сигнала от α -атома фосфора. Положение и мультиплетность (триплет, $J_{\text{P-P}}$ 19,2 Гц) сигнала в области 23,0 м. д. соответствует таковым для β -атома фосфора трифосфатной группы [3, 4].

Нами была также изучена возможность выделения полифосфорилированных производных пиридоксаль из смеси продуктов фосфорилирования пиридоксалиден-*n*-анизидина (VI), так как известно, что в описанном методе синтеза пиридоксаль-5'-фосфата обработкой шиффовых оснований пиридоксаль полифосфорной кислотой образуется некоторое количество полифосфатов [5]. ТСХ реакционной массы, полученной нами после фосфорилирования соединения (VI) и обработки реакционной смеси водой при 0°, обнаружила присутствие преобладающего количества монофосфата пиридоксаль и некоторое количество ди- и трифосфатов. Препаративное разделение соединений проводили хроматографией смеси на колонке с амберлитом IRC-50 (H⁺) (элюция водой). Вследствие малого содержания в реакционной массе трифосфата его не удалось выделить в индивидуальном состоянии. Шиффово основание дифосфата, полученное в ви-

де гидрата при упаривании соответствующих фракций, было разложено обработкой дауэксом 50W × 4 (H⁺). Выделенная при этом Na-соль дифосфата по своим физико-химическим свойствам была полностью идентична препаратам (II), полученным описанными выше методами.

Экспериментальная часть

УФ-спектры измеряли на приборе Specord UV-VIS (ГДР), ³¹P-ЯМР-спектры — на приборе XL-100-15 (Varian, США) при частоте ³¹P 40, 5МГц в D₂O с тринатрийфосфатом в качестве внутреннего стандарта (с — синглет, д — дублет, т — триплет). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV 254 в системе пропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (А), БХ — на бумаге Filtrak FN-3 в системе изомасляная кислота — 1 М NH₃ — 0,1 М трилон Б, 100 : 60 : 1,6 (Б). Электрофорез осуществляли на бумаге Filtrak FN-3 в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) (В) или в 0,02 М ацетатном буфере (рН 3,5) (Г) при градиенте напряжения 21,4 В/см.

Пиридоксаль-5'-фосфоморфолидат (IV). К раствору 0,53 г пиридоксаль-5'-фосфата (I) и 0,78 мл свежеперегнанного морфолина в 15 мл хлороформа при 45° и перемешивании прибавляли в течение 1,5 ч по каплям раствор 1,04 г ДЦГК в 10 мл хлороформа и смесь выдерживали при перемешивании 4 ч при 45° и 15 ч при 20°. Осадок дициклогексилмочевинвы отделяли, раствор упаривали в вакууме, остаток растирали с 20 мл смеси гексан — эфир (1 : 1) и выпавшее маслообразное вещество, затвердевающее при высушивании над P₂O₅, отделяли. Получали 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксамидиниевую соль пиридоксаль-5'-фосфоморфолидата, выход 1,13 г (94%), R_f 0,73 (А), E₍₁₎ 0,82 (Б).

Найдено, %: N 11,09; P 4,58. C₁₂H₁₆N₂O₆P · C₁₇H₃₂N₃O. Вычислено, %: N 11,49; P 5,08.

Пиридоксаль-5'-дифосфат (III). а) К раствору 200 мг соли пиридоксаль-5'-фосфоморфолидата в 2 мл ДМФА прибавляли по каплям раствор 0,75 г трибутиламмониевой соли ортофосфорной кислоты в 4 мл ДМФА. Смесь перемешивали без доступа влаги 48 ч и затем подвергали препаративному разделению на пластинках с силикагелем Л 40/100 мкм в системе А, выделяя зону с R_f 0,22 (выход 100 мг). 40 мг этой зоны растворяли в 5 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (НСО₃⁻) (2 × 25 см), которую промывали водой и затем элюировали триэтиламмоний-бикарбонатным буфером (рН 7,5) в градиенте концентрации от 0 до 0,4 М (общий объем 3 л, скорость элюции 30 мл/ч, фракции по 15 мл, регистрация оптической плотности элюата при 280 нм). Фракции с 44-й по 56-ю объединяли, упаривали при температуре ниже 40°, остаток растворяли в 50 мл 80% этанола и вновь упаривали. К остатку (25 мг) прибавляли 0,5 мл метанола и раствор 160 мг перхлората натрия в 10 мл ацетона. Осадок отделяли центрифугированием и промывали ацетоном (3 × 4 мл). Получали 10 мг (19%) натриевой соли пиридоксаль-5'-дифосфата; R_f 0,22 (А), R_f 0,56 (Б); E₍₁₎ 0,75 (В); E₍₁₎ 1,88 (Г); УФ [0,2 М фосфатный буфер, рН 6,95, λ_{макс}, нм (ε)]: 231 (12 000), 325 (2500), 384 (5100); (0,1 н. NaOH): 230 (14 400), 310 (1040), 387 (6500); (0,1 н. HCl): 297 (7500); ³¹P-ЯМР (δ, м. д.): 6,77 (д, P^β, J_{P-Р} 19 Гц); 10,59 (д, P^α, J_{P-Р} 19 Гц).

б) 60 мг смеси, полученной от препаративного разделения, описанного в опыте а, растворяли в 5 мл воды и наносили на колонку (2,2 × 37 см) с дауэксом 2 × 10 (Cl⁻, 200—400 меш). Промывали водой, а затем элюировали раствором хлористого лития в градиенте концентраций от 0 до 0,45 М (общий объем 3 л, скорость элюции 30 мл/ч, фракции по 15 мл). Фракции с 44-й по 56-ю объединяли, нейтрализовали 0,1 М раствором гидрата окиси лития до рН 7,4 и упаривали досуха в вакууме при температуре не выше 40°. Остаток растворяли в 6 мл воды, прибавляли 100 мл ацетона, осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном (3 × 5 мл) до отсутствия в маточном растворе иона Cl⁻ и переосаждали 20 мл ацетона

из 2 мл воды. Получали 14 мг литиевой соли пиридоксаль-5'-дифосфата. По данным УФ-спектра, ТСХ и электрофореза, вещество идентично соединению, полученному в опыте *a*.

Пиридоксаль-5'-трифосфат (V). Раствор 200 мг 4-морфолин-N,N'-дихлоргексилкарбоксамидиниевой соли пиридоксаль-5'-фосфоморфолида-та в 5 мл ДМФА прибавляли по каплям при перемешивании к раствору 1,45 г бис-трибутиламмониевой соли пирофосфатной кислоты [6] в 10 мл ДМФА. Перемешивали 48 ч при 20°, разбавляли 100 мл воды и наносили на колонку (15 × 53 см) с дауэксом 2 × 10 (Cl⁻, 200—400 меш). Колонку промывали водой, а затем элюировали раствором хлористого лития в линейном градиенте концентраций от 0 до 0,4 М в 0,0015 н. HCl (общий объем 4 л, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракций 12 мл). Фракции с 90-й по 120-ю объединяли, доводили 0,1 н. гидроокисью лития до pH 7,5 и упаривали в вакууме при температуре не выше 35°. Остаток растворяли в 3 мл 30% метанола и осаждали 60 мл ацетона. Осадок отделяли центрифугированием, промывали безводным этанолом (2 раза по 4 мл) и пересаждали 20 мл ацетона из 2 мл воды. Получали 40 мг (26,8%) литиевой соли пиридоксаль-5'-трифосфата; R_f 0,14 (A), R_f 0,47 (B), $E_{(1)}$ 2,0 (Г); УФ [0,1 н. HCl, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ε)]: 297 (4600); (0,05 М фосфатный буфер, pH 7,0): 222 (8000), 231 (7700), 325 (1500), 385 (3100); (0,1 н. NaOH): 230 (8900), 310 (850), 388 (4000); ¹H-ЯМР (D₂O, δ, м. д.): 2,41 (с, 2-CH₃), 5,88 (д, $J_{\text{H-P}}$ 7 Гц, 5-CH₂), 7,71 (с, 6-H); ³¹P-ЯМР (D₂O, δ, м. д.): 9,0 (д, P^α , $J_{\text{P-P}}$ 19,2 Гц), 12,5 (квинтет, P^α , $J_{\text{P-P}}$ 19,2 Гц, $J_{\text{P-H}}$ 9,0 Гц), 23,0 (т, P^β , $J_{\text{P-P}}$ 19,2 Гц).

*Разделение продуктов фосфорилирования пиридоксилден-*n*-анизидина (VI)*. К 5 г пятиокси фосфора прибавляли при перемешивании 6,5 г 85% ортофосфорной кислоты и перемешивали при 100° до гомогенизации. Смесь охлаждали до комнатной температуры, прибавляли 1 г пиридоксилден-*n*-анизидина, перемешивали 4 ч при 45°, охлаждали до 0°, прибавляли по каплям 20 мл ледяной воды и наносили на колонку со 150 мл амберлита IRC-50 (H⁺). Колонку элюировали водой со скоростью 30 мл/ч, собирая фракции по 15 мл и регистрируя оптическую плотность при 280 нм. Фракции с 25-й по 40-ю, содержащие шиффово основание дифосфата (III), упаривали при температуре не выше 40°, остаток сушили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅ и получали 150 мг (11%) шиффова основания дифосфата с анизидином.

Найдено, %: С 40,45; Н 4,51; N 5,85; P 13,77. C₁₅H₁₈N₂O₉P₂·H₂O. Вычислено, %: С 40,0; Н 4,47; N 6,22; P 13,75.

100 мг полученного соединения суспендировали в 100 мл воды и встряхивали с 8 мл дауэкса 50W × 4 (H⁺) до полного растворения. Смолу отделяли и промывали водой (200 мл). Объединенные водные растворы дифосфата доводили триэтиламоний-бикарбонатным буфером до pH 7,5 и упаривали в вакууме при 35°. Остаток растворяли в 80% этаноле, вновь упаривали, растворяли в 2 мл метанола и прибавлением 350 мг перхлората натрия в 20 мл ацетона осаждали 65 мг (78,5%) натриевой соли дифосфата (III). По физико-химическим свойствам вещество идентично натриевой соли (III), полученной морфолидным методом.

Авторы выражают глубокую признательность Г. И. Яковлеву за измерение и обсуждение спектров ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Papas T. S., Pry T. W., Marciani D. J. (1977) J. Biol. Chem., 252, 1425—1430.
2. Martial J., Zaldivar J., Bull P., Venegas A., Valenzuela P. (1975) Biochemistry, 14, 4907—4911.
3. Sloan D. L., Loeb L. A., Mildvan A. S. (1975) J. Biol. Chem., 250, 8913—8920.
4. Cohn M., Huges T. K. (1960) J. Biol. Chem., 235, 3250—3253.

5. O'Leary M. H., Payne J. R. (1976) *J. Biol. Chem.*, 258, 2248—2254.
6. Moffat J. G., Khorana H. G. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 649—655.

Поступила в редакцию
14.X.1977

SYNTHESIS OF PYRIDOXAL 5'-DI- AND TRIPHOSPHATES

L'VOVA S. D., KARPEISKY A. M., GUNAR V. I.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

The synthesis of pyridoxal 5'-phosphomorpholidate has been performed. Condensation of the title compound with ortho- and pyrophosphoric acid salts afforded pyridoxal 5'-diphosphate and pyridoxal 5'-triphosphate, respectively.
