



УДК 577.15.013.07

## НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

XXXIII \*. СИНТЕЗ И ТАУТОМЕРИЯ 8-ОКСИ(НОР)ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА

Глебова Г. Д., Березовский В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Фосфорилированием 8-окси(нор)рибофлавина впервые синтезирован природный 8-окси(нор)флавиномононуклеотид. В водном растворе вещество находится в двух таутомерных формах: в бензохинондной 8-оксоформе при pH 6,9 и выше и в фенольной 8-оксиформе при pH 3,5 и ниже. Обе таутомерные формы охарактеризованы спектрами поглощения в УФ- и видимой области и спектрами флуоресценции. Определены величины  $pK_a$  и  $K_f$ . Реакция фосфорилирования сопровождается образованием 4'-фосфата и 5'-дифосфата 8-окси(нор)рибофлавина.

Простетической группой двух флавопротеидов: NADH-дегидрогеназы (КФ 1.6.99.3) из *Peptostreptococcus elsdenii* [1] и электронпереносящего флавопротеида из того же источника [2] является 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотид. Обработка его фосфодиэстеразой привела к получению 8-окси(нор)флавиномононуклеотида (II) [2].

Мы впервые синтезировали 8-окси(нор)флавиномононуклеотид, 8-окси(нор)рибофлавин-5'-фосфат (II) из 8-окси(нор)рибофлавина (I) [3] фосфорилированием его реагентом из метилового спирта и хлорокиси фосфора, содержащим диметиловый эфир хлорангидрида ортофосфорной кислоты, аналогично [4], изучили таутомерные формы (IIa) и (IIб) этого соединения и некоторые другие свойства. Предварительное сообщение об этом синтезе см. [5].

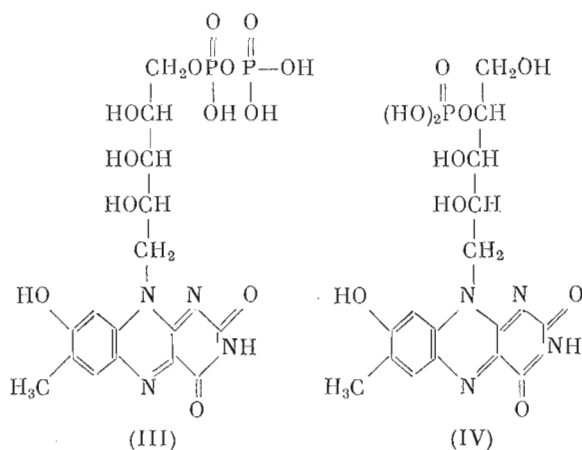
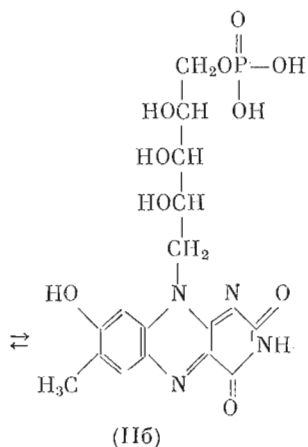
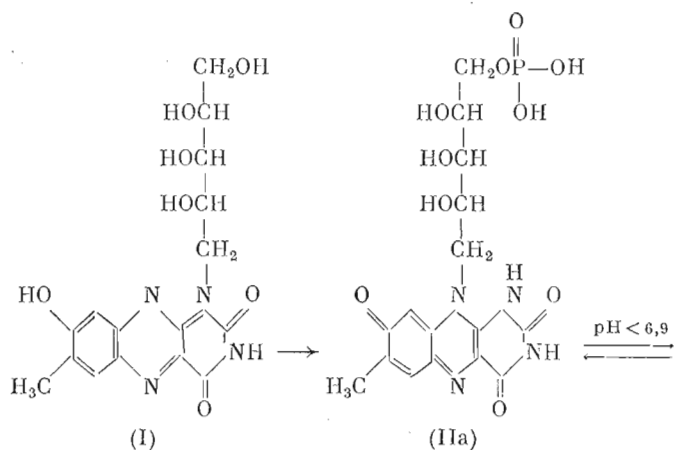
Реакция фосфорилирования флавина (I) идет преимущественно по первичной гидроксильной группе положения 5' рибитильной цепи с образованием главным образом диметиловых эфиров 5'-монофосфата 8-окси(нор)рибофлавина (II), частично 5'-дифосфата (III) и в небольшой степени 4'-фосфата 8-окси(нор)рибофлавина (IV).

Фенольный гидроксил положения 8 флавина (I) не фосфорилируется. После гидролиза смеси диметиловых эфиров образуются фосфаты (II-IV).

Разделение смеси фосфатов проводили на катионите КУ-2 в  $H^+$ -форме [6] или гель-фильтрацией на сефадексе G-10 или G-25. Дополнительное разделение осуществляли хроматографированием на целлюлозе.

8-Окси(нор)рибофлавин-5'-фосфат (II) получен в виде твердого вещества оранжевого цвета. Его разбавленные водные и спиртовые растворы имеют оранжевую окраску и при возбуждении УФ-светом обладают интенсивной желто-зеленой флуоресценцией, характерной для рибофлавина и его мононуклеотида.

\* Сообщение XXXII см. «Биоорганическая химия» (1979) 5, № 1, 47-55.



Электронный спектр поглощения 8-окси(нор)флавиномононуклеотида (II) в воде (табл. 1) при pH 6,9–10 характеризуется полосами с  $\lambda_{\text{макс}}$  253, 303 и 473\* нм и плечом при 268 нм; он резко отличается от спектра поглощения флавиномононуклеотида (FMN) ( $\lambda_{\text{макс}}$  445 нм в длинноволновой области). Кроме того, в спектре отсутствует полоса поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  374 нм, характерная для FMN и появляется новая, малоинтенсивная полоса с  $\lambda_{\text{макс}}$  303 нм. Этот спектр поглощения относится к таутомерной «беззохиноид-

\* По [7], 475 нм,  $\epsilon \cdot 10^{-3}$  36,4.

УФ- и видимый спектры поглощения флавинов (I–IV) в воде

Соединение	Характеристика	Оксиформа							
		рН —1				рН 3,5			
8-Окси (нор) рибофлавин (I)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	235	260	427	235	263	283 пл	441	
		26,3	22,2	30,3	36,3	29,4	11,7	25,8	
8-Окси (нор) рибофлавин-5'-фосфат (II)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	236	261	427	236	263	283 пл	442	
		27,5	23,6	32,4	37,4	31,3	14,3	27,5	
8-Окси (нор) рибофлавин-4'-фосфат (IV)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	237	261	428	237	263	283 пл	443	
		28,8	24,9	28,8	32,3	28,6	13,4	24,9	
8-Окси (нор) рибофлавин-5'-дифосфат (III)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	236	261	447	237	263	283 пл	442	
		31,5	28,6	34,1	36,7	32,1	14,6	27,9	

Соединение	Характеристика	Оксоформа							
		рН 5,7–8,0				рН 13,0			
8-Окси (нор) рибофлавин (I)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	рН	252	268 пл	302	472	249	285	476
		5,7	50,5	25,5	8,9	35,6	54,6	12,1	50,6
8-Окси (нор) рибофлавин-5'-фосфат (II)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	рН	253	268 пл	303	473	249	288	478
		6,9	46,7	24,7	10,4	39,6	50,0	12,1	48,4
8-Окси (нор) рибофлавин-4'-фосфат (IV)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	рН	253	268 пл	303	473	250	288	480
		7,1	49,8	26,7	13,8	39,6	47,9	10,1	46,6
8-Окси (нор) рибофлавин-5'-дифосфат (III)	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\epsilon \cdot 10^{-3}$	рН	253	268 пл	303	472	249	288	478
		8,0	48,9	27,4	12,2	39,6	53,0	11,6	49,5

Таблица 2

Константы таутомерного равновесия ( $K_t = \frac{c_a}{c_b}$ ) флавинов (IIa) и (IIб) в водном растворе при различных рН

рН	6,5	6,15	5,8	5,3	5,0	4,9	4,5	4,0
$K_t$	53,0	12,7	6,9	2,4	1,8	0,93	0,4	0,08

ной» 8-оксоформе (IIa). При рН 2–3,5 образуется вторая таутомерная «фенольная» 8-оксоформа (IIб), которая характеризуется спектром поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  236, 263 и 442 нм и плечом при 283 нм (рис. 1).

Отнесение 8-окси(нор)-FMN (II) к той или иной таутомерной форме мы сделали по аналогии с 8-окси(нор)рибофлавином (I), для которого таутомерные формы были установлены по спектрам поглощения, ИК- и ПМР-спектрам, а также другими данными [3]. Наличие у флавина (IIa) хиноидной структуры бензольного цикла, конденсированного с птеридиновым циклом изоаллоксазиновой молекулы с оксогруппой в положении 8 вызывает углубление цвета, батохромное смещение длинноволновой полосы поглощения на 28 нм по сравнению с FMN и резкое возрастание интенсивности поглощения этой полосы.

Протомирование 8-оксиформы (IIб) при рН —1 (6 н. HCl) вызывает гипсохромный сдвиг длинноволнового максимума до 427 нм. Протомирование идет, по-видимому, по N1-атому, константа ионизации  $pK_a$  0,3. Флуоресценция отсутствует.

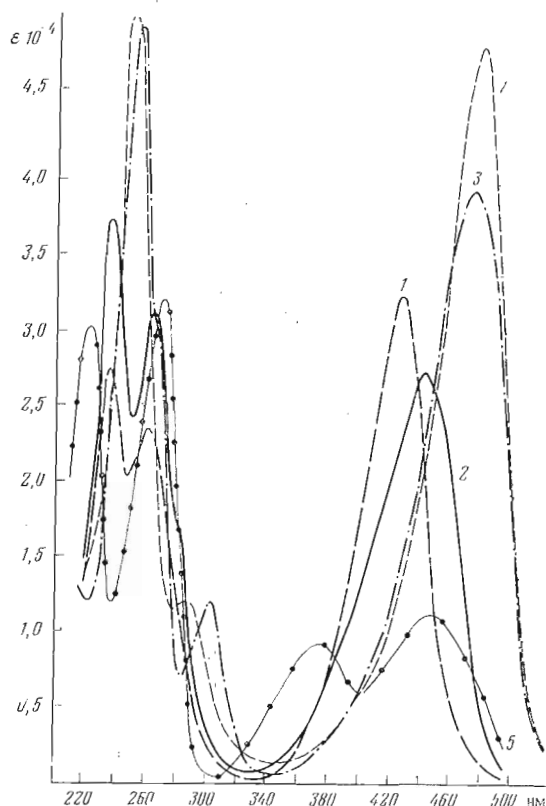


Рис. 1. Спектры поглощения таутомernih форм 8-окси(нор)-FMN (II) при рН -1 (1), 3,5 (2), 7,0 (3), 12,5 (4); 5 - спектр поглощения FMN при рН 7,0

Анионная форма оксоптаутомера (IIa) при рН 13,0 имеет три максимума: 249, 288 и 478 нм. Начало образования анионной формы происходит при увеличении рН выше 11 с изменением и смещением полосы поглощения с максимумом 303 нм 8-оксоптаутомера (IIa) в коротковолновую область. Депротонирование характеризуется  $pK_a$  11,5 и, по-видимому, идет по N1-Н.

Для флавина (II) при рН от 8 до 3 происходит плавный переход в коротковолновую область полос поглощения: 473→441 нм, 303→263 нм, 253→→235 нм, причем в этом переходе наблюдаются четкие изобестические точки при 448, 323, 289, 260 и 243 нм, свидетельствующие о таутомерном переходе бензохиноидной оксоформы (IIa) в фенольную оксиформу (IIб) (рис. 2).

В интервале рН 3,5—6,9 наблюдается равновесное состояние таутомernih форм (IIa) и (IIб), определенное для каждого значения рН; при рН 4,9 в равновесии находится примерно равное количество таутомеров IIa и IIб ( $c_a$  48,2% и  $c_b$  51,8% соответственно; табл. 2). Найденное  $pK_a$  4,8 относится к смеси таутомеров и может быть отнесено как к C8-OH, так и к N1-Н. Прототропная перегруппировка (IIб)⇌(IIa) связана с миграцией протона от гидроксильной группы положения 8 к атому азота положения 1 и характеризуется перестройкой и возрастанием сопряжения π-электронной системы молекулы изоаллоксазина.

Количественное соотношение таутомеров (IIa) и (IIб) в водном растворе при различных рН представлено на рис. 2.

Интервал рН, при котором наблюдается прототропная перегруппировка таутомеров (IIa) и (IIб), несколько смещен и растянут в нейтральную

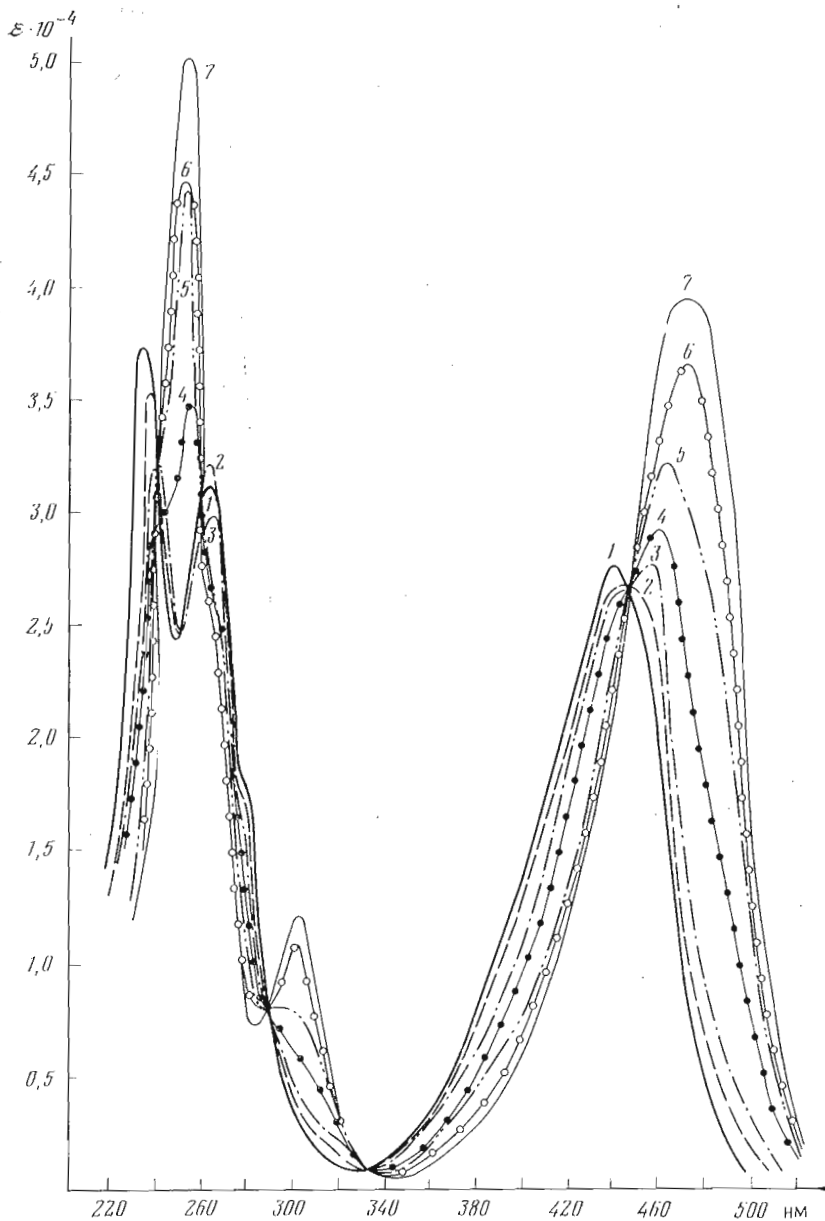


Рис. 2. Спектры поглощения таутомерных форм 8-окси(нор)-FMN (II) при pH 3,5 (1), 3,9 (2), 4,3 (3), 4,9 (4), 5,3 (5), 6,15 (6), 7,6 (7)

область по сравнению с таутомерными формами 8-окси(нор)рибофлавина [3].

Флуоресценция 8-окси(нор)-FMN (II) в нейтральном или кислом (pH 3,5) водном растворе имеет желто-зеленую окраску при возбуждении УФ- или видимым светом и выявляет наличие двух таутомерных форм, которым отвечают две различные полосы флуоресценции с  $\lambda_{\text{фл}}$  530 и 506 нм: бензохиноидной 8-оксоформы (IIa) и фенольной 8-оксиформы (IIб) соответственно. Интенсивность флуоресценции обеих этих форм значительно меньше интенсивности флуоресценции FMN ( $\lambda_{\text{фл}}$  522 нм), при пятой за 100% (рис. 3). Следует отметить, что  $\lambda_{\text{фл}}$  8-оксоформы (IIa) по сравнению с FMN смещена на 8 нм в длинноволновую, а 8-окситаутомера

(IIб) — на 16 нм в коротковолновую область спектра, что свидетельствует об уменьшении сопряжения  $\pi$ -электронной системы молекулы.

Интенсивность флуоресценции флавиона (II) также находится в характерной зависимости от pH водного раствора (рис. 4). Таутомер (IIа) имеет меньшую интенсивность флуоресценции, чем таутомер (IIб); катионная форма (pH  $\approx$  -1) не флуоресцирует.

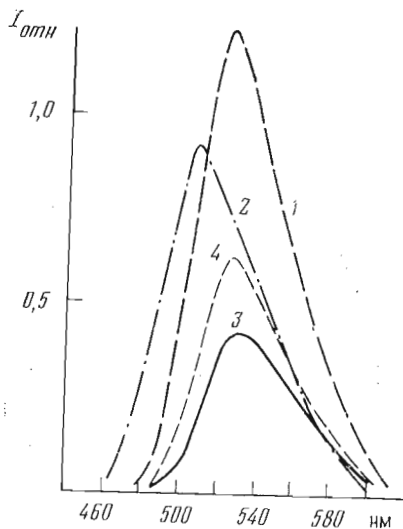


Рис. 3. Спектр флуоресценции 8-окси(нор)-FMN (II) в воде: 1 — pH 3,5; 2 — pH 7,6; 3 — pH 13,0; 4 — FMN при pH 7,0 ( $c \cdot 10^{-2}$  г/л,  $\lambda_{\text{возб}}$  445 нм, данные не корректированы)

Концентрация водородных ионов влияет на длину волны флуоресценции флавиона (II) — изменение происходит в интервале pH 4–6 (рис. 5). Для сравнения на этом же рисунке приведена флуоресценция FMN, которая имеет одну и ту же длину волны в широком диапазоне pH 2–10.

Данные по флуоресценции флавиона (II) коррелируют со спектрами поглощения этого соединения и свидетельствуют о том, что в физиологических условиях 8-окси(нор)флавиномононуклеотид (II) находится в 8-оксохиноидной форме (IIа).

В растворе протонных и апротонных органических растворителей 8-окси(нор)флавиномононуклеотид (II) может находиться в той или другой таутомерной форме. Так, в уксусной кислоте он находится в оксиформе (IIб), что характеризуется длинноволновыми  $\lambda_{\text{макс}}$  430 нм и  $\lambda_{\text{фл}}$  504 нм (рис. 6 и 7а), аналогичными 8-окси(нор)рибофлавиону (Iб) в таутомерной оксиформе, у кото-

рого  $\lambda_{\text{макс}}$  442 нм,  $\lambda_{\text{фл}}$  501 нм (рис. 7б). В спирте (метиловом или этиловом) флавион (II) существует в фенольной оксиформе (IIб) с  $\lambda_{\text{макс}} \sim 446$  нм (размытый максимум в пределах 440–452 нм, другие максимумы в УФ-области при 237 и 265 нм); максимум 303 нм, характерный для оксоформы (IIа), отсутствует,  $\lambda_{\text{фл}}$  501 нм (рис. 6 и 7а).

Следует отметить, что в метиловом спирте 8-метокси(нор)рибофлавион с «закрепленной» оксиформой имеет  $\lambda_{\text{фл}}$  500 нм, в то время как 8-окси(нор)рибофлавион —  $\lambda_{\text{макс}}$  478 нм и  $\lambda_{\text{фл}}$  520 нм (рис. 7б), что отвечает бензохиноидной оксоформе (Iа). В растворе пиридина флавион (II) имеет полосы поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  440 и 457 нм,  $\lambda_{\text{фл}}$  495 и плечо 520 нм (рис. 6 и 7а) и по структуре, по-видимому, его можно отнести к смеси таутомеров с преимущественным содержанием оксиформы (IIб) в отличие от флавиона (I), который, вероятно, находится в пиридине в виде смеси таутомеров с преимущественным содержанием оксоформы (Iа) ( $\lambda_{\text{макс}}$  440 и 460 нм,  $\lambda_{\text{фл}}$  520 нм и плечо 495 нм) (рис. 7б). Таутомерная форма флавиона (II) в растворе диметилформамида —  $\lambda_{\text{макс}}$  470 и  $\sim 310$  нм,  $\lambda_{\text{фл}}$  522 нм с плечом 495 нм (рис. 6 и 7а) — может быть отнесена к смеси с преимущественной бензохиноидной оксоформой (IIа) в отличие от флавиона (I), который в диметилформамиде находится в оксоформе (Iб) —  $\lambda_{\text{макс}}$  476–478 и 504–505 нм,  $\lambda_{\text{фл}}$  526 нм (рис. 7б).

Таким образом, в растворе пиридина или диметилформамида фосфатная группа флавиона (II) смещает таутомерное равновесие в сторону фенольной оксиформы (IIб) по сравнению с флавином (I).

В спектре ПМР в  $D_2O$  8-окси(нор)рибофлавион-5'-фосфата (оксиформа (IIб) при pD 4,4) отмечены в области ароматических протонов два однопротонных синглетных сигнала с  $\delta$  7,20 и 6,78 м.д., которые мы относим к 6-Н и 9-Н соответственно. При pD 6,7 в условиях предельного смещения:

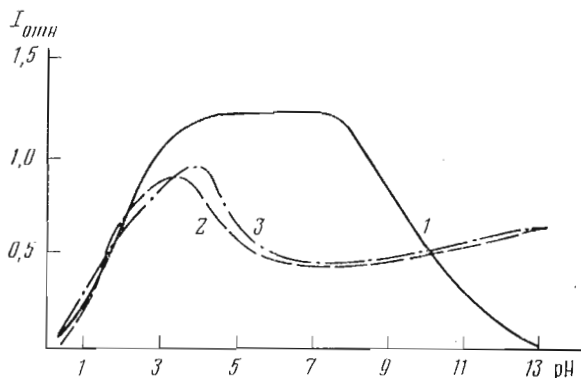


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции флавинов от рН водного раствора: 1 - 8-окси(нор)-FMN (II); 2 - 8-окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфат (III); 3 - FMN ( $c \cdot 10^{-2}$  г/л;  $\lambda_{\text{возб}}$  445 нм, данные не корректированы)

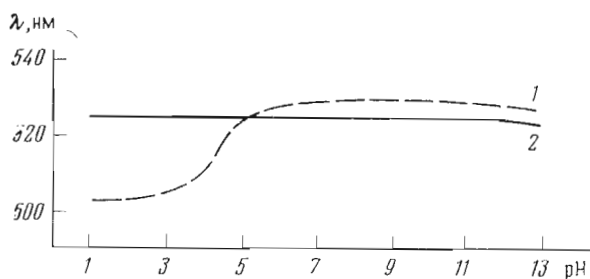


Рис. 5. Зависимость длины волны флуоресценции флавинов от рН водного раствора: 1 - 8-окси(нор)-FMN, 2 - FMN ( $c \cdot 10^{-2}$  г/л,  $\lambda_{\text{возб}}$  445 нм, данные не корректированы)

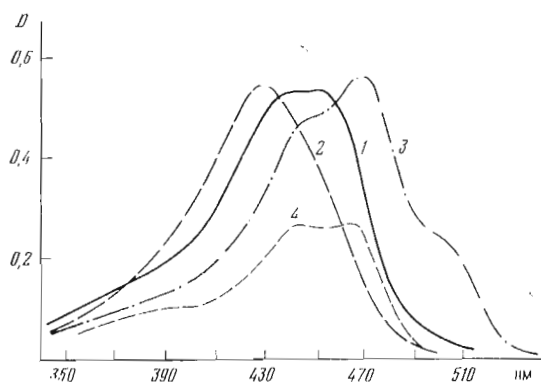


Рис. 6. Видимый спектр поглощения 8-окси(нор)-FMN в метиловом спирте (1), уксусной кислоте (2), диметилформамиде (3), пиридине (4)

термодинамического равновесия в сторону образования бензохиноидной оксоформы (IIa) сигнал протона положения 9 сдвигается в область сильного поля на 0,45 м.д.

Образующиеся при реакции фосфорилирования 8-окси(нор)рибофлавина (I) фосфаты (III) и (IV) подвергнуты дополнительному хроматографическому разделению на бумаге и электрофорезу (табл. 3). Хроматографическая подвижность 5'-дифосфата (III) в системах Б и В больше под-

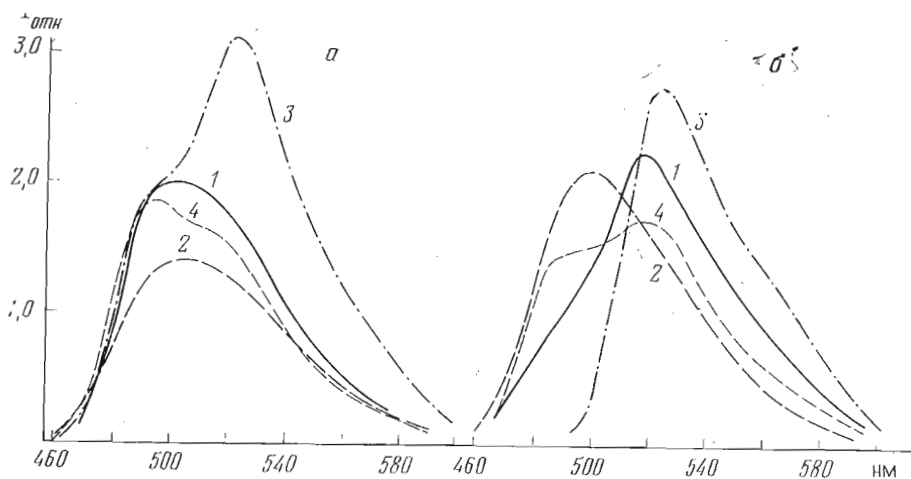


Рис. 7. Спектры флуоресценции 8-окси(нор)-FMN (а), 8-окси(нор)рибофлавина (б) в метиловом спирте (1), уксусной кислоте (2), диметилформамиде (3), пиридине (4); с  $10^{-2}$  г/л,  $\lambda_{возб}$  445 нм, данные не скорректированы

вижности 5'-монофосфата (II) и находится в соответствии со значениями  $R_f$  для FMN. Флавины (IV) мы приписали строение 4'-фосфата аналогично данным для рибофлавин-4'-фосфата и FMN [8].

Фосфаты флавинов (III–IV) в водных и спиртовых растворах имеют электронный спектр поглощения (табл. 1), подобный флавины (II), а также типичную желто-зеленую флуоресценцию. Флавины (III–IV) в водном растворе существуют в виде двух таутомерных форм аналогично флавины (II). В спектре поглощения 8-окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфата (III) при pH 3–8 происходит плавный переход полос поглощения в коротковолновую область от бензохиноидной оксоформы к фенольной оксоформе, причем наблюдается несколько четких изобестических точек с теми же значениями, что и для флавина (II) (рис. 8). Определены константы таутомерного равновесия флавинов (IIIа) и (IIIб) в зависимости от pH водного раствора (табл. 4).

Таблица 3

Хроматографическая и электрофоретическая подвижность флавинов

Соединение	$R_f$ в системах			$E_f$ , см	
	А	Б	В	pH 3,5	pH 8,2
8-Окси(нор)рибофлавин-5'-фосфат (II)	0,25	0,54	0,77	+3,4	+6,0
8-Окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфат (III)	0,18	0,72	0,88	+6,0	+8,0
FMN	0,29	0,68	0,87	+3,6	+4,7

Таблица 4

Константы таутомерного равновесия ( $K_t$ ) флавинов (IIIа) и (IIIб) в водном растворе при различных pH

pH	7,6	7,15	6,5	6,15	5,5	5,0	4,6	3,9
$K_t$	41,2	9,9	3,0	1,79	0,99	0,50	0,20	0,03



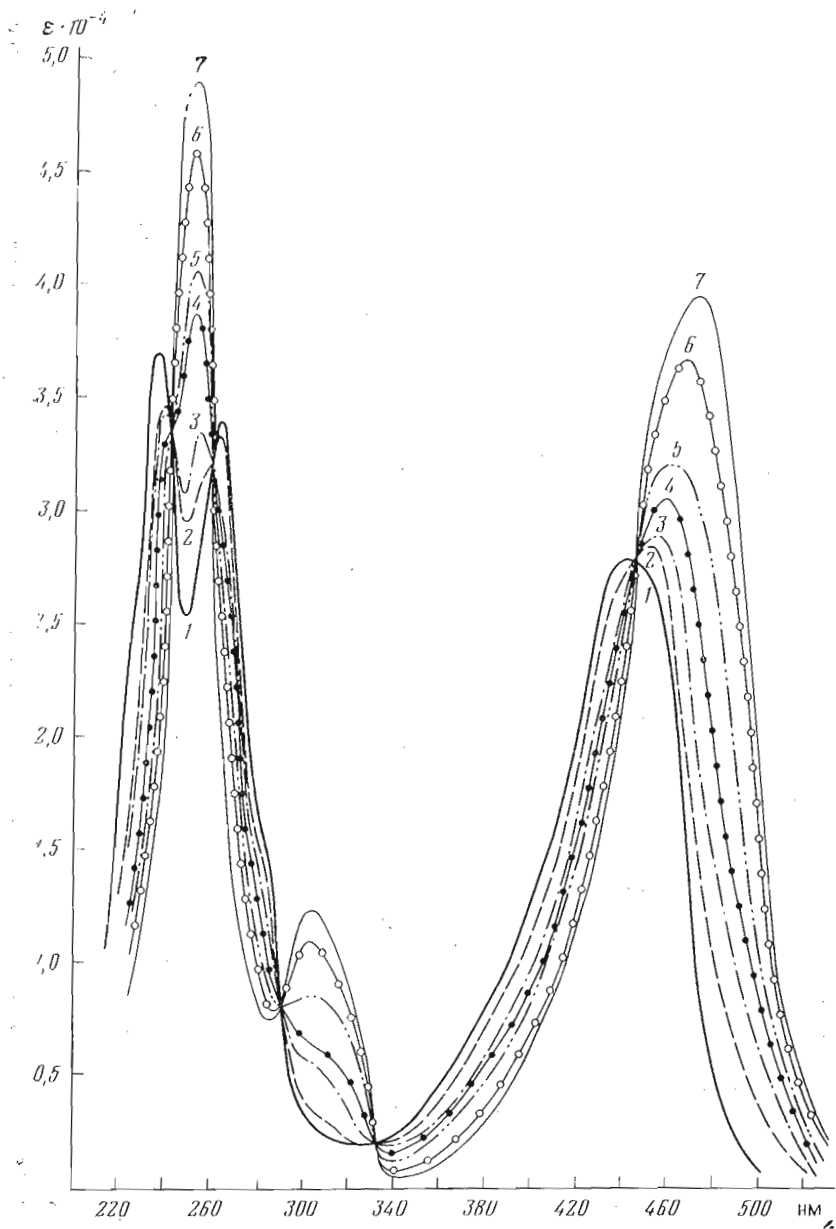


Рис. 8. Спектры поглощения таутомерных форм 8-окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфата (III) при рН 3,5 (1), 4,6 (2), 5,0 (3), 5,5 (4), 6,1 (5), 7,1 (6), 8,0 (7)

Интервал обратимого перехода таутомерных форм (IIIa) и (IIIб) находится в пределах рН 3,9–8,0 и по сравнению с таутомерами (IIa) и (IIб) сдвигнут в щелочную сторону. В равновесии при рН 5,5 находится равное количество таутомеров.

8-Окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфат (III) при возбуждении УФ- или видимым светом в водном растворе имеет желто-зеленую флуоресценцию, бензохиноидная оксоформа (IIIa) имеет  $\lambda_{\text{фл}}$  530 нм, а фенольная оксоформа (IIIб) – 506 нм. Таутомерные формы имеют различную интенсивность флуоресценции, причем таутомер (IIIб) большую, чем таутомер (IIIa) (рис. 4). Длина волны флуоресценции флавина (III) находится в зависимости от рН. Эта зависимость аналогична флуоресценции флавина (II).

## Экспериментальная часть

Электронные спектры поглощения сняты на спектрофотометре EPS-3T, спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре MPF-2A (оба фирмы Hitachi, Япония). Флуоресценцию возбуждали светом с  $\lambda$  445 нм. Растворители для спектральных измерений подвергали специальной очистке. Спектры ПМР исследуемых соединений сняты на приборе WP-80 (Bruker, ФРГ) в D<sub>2</sub>O, химические сдвиги измерены в шкале  $\delta$ , внутренний эталон — натриевая соль 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислоты. Точность измерения химических сдвигов  $\pm 0,01$  м.д. Электрофорез проводили на бумаге FN-2 (ГДР) на приборе ЭМИБ (СССР, Киев) при pH 3,5 (система Б) и 8,2 (система В, см. ниже). Напряжение на выходе с выпрямителя 400 В, градиент потенциала на бумаге 15 В/см, продолжительность электрофореза 3—4 ч. Хроматографический анализ проводили на бумаге FN-2 и FN-8 (ГДР) в восходящем потоке в системах: А — пиридин — изобутиловый спирт — вода — уксусная кислота, 33:33:33:1; Б — ацетатный буферный раствор, pH 3,5; В — фосфатный буферный раствор, pH 8,2. Потенциометрическое титрование проводили на приборе ЛПУ-01.

Данные электронных спектров поглощения и флуоресценции, а также хроматографической и электрофоретической подвижности синтезированных соединений приведены в табл. 1 и 3.

*8-Окси(нор)рибофлавин-5'-фосфат(II)*. К 8 мл свежеперегнанной хлорокси фосфора по каплям при охлаждении добавляли 7 мл метилового спирта, перемешивали 10 ч (20—25° С) и оставляли на 16 ч. К образовавшемуся раствору небольшими порциями прибавляли 2 г 8-окси(нор)рибофлавина и нагревали 3 ч (45—50° С). Реакционную смесь охлаждали, добавляли при перемешивании 6 мл воды и нагревали 30 мин при 80° С. После охлаждения обрабатывали 40 мл *n*-бутилового спирта и оставляли на 20 ч при 5—10° С. Выделившийся осадок отфильтровывали, растирали с эфиром (25 мл), вновь отфильтровывали. Получали 1,3 г смеси фосфатов желтовато-коричневого цвета, содержащей 60% соединения (II).

Для разделения фосфатов и очистки 0,8 г смеси фосфатов растворяли в 8 мл воды, нейтрализовали 1п. NaOH до pH 6,5, наносили на колонку (5×115 см) с сефадексом G-10 (мелкий) и элюировали водой, насыщенной толуолом, со скоростью 1,5 мл/мин; первоначально вымывалось соединение (III), затем соединения (II) и (IV). Собирали фракции по 30 мл, хроматографировали их на бумаге в системе А, объединяли фракции, содержащие одно пятно с  $R_f$  0,25 в системе А (бумага FN-2) (табл. 3), упаривали в вакууме досуха при 30—40° С, остаток промывали смесью спирт — эфир (1 : 1, 10 мл). Выход моонатриевой соли 8-окси(нор)рибофлавин-5'-фосфата(II) 0,3 г (53%) — в виде коричневатого порошка с чистотой 85%.

Для дальнейшей очистки на плотную хроматографическую бумагу, предварительно промытую водой, наносили водный раствор соединения(II) с чистотой 85% и хроматографировали в системе А. Полосу с  $R_f$  0,30 (система А, бумага FN-8) элюировали водой, упаривали досуха в вакууме. Для выделения свободного фосфата обрабатывали ионообменной смолой КУ-2 в H<sup>+</sup>-форме. Получали мелкокристаллический осадок коричнево-оранжевого цвета, т. пл. >300° С. ПМР в D<sub>2</sub>O при  $\rho$ D 4,4,  $\delta$ , м.д.: 7,20 с (1H, 6-H), 6,78 с (1H, 9-H), 2,10 с (3H, 7-CH<sub>3</sub>); при  $\rho$ D 6,7: 7,14 с (1H, 6-H), 6,33 с (1H, 9-H), 2,00 с (3H, 7-CH<sub>3</sub>). Найдено, %: N 12,27; P 6,17. C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>P. Вычислено, %: N 12,22; P 6,76.

*8-Окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфат(III)*. Последующие фракции элюата с колонки с сефадексом G-10 (мелкий) из опыта, описанного выше, содержащие одно пятно с  $R_f$  0,18 в системе А (бумага FN-2), упаривали при 30—40° С в вакууме досуха, промывали смесью спирт — эфир (1 : 1, 10 мл). Выход моонатриевой соли 8-окси(нор)рибофлавин-5'-дифосфата(III) 0,15 г (23%) — в виде коричневатого порошка с чистотой

той 80%. Дальнейшую очистку проводили так, как описано для соединения (II). Найдено, %: С 37,29; Н 3,78; Р 11,55;  $C_{16}H_{22}N_4O_{12}P_2$ . Вычислено, %: С 36,76; Н 3,86; Р 11,86.

8-Окси(нор)рибофлавин-4'-фосфат(IV). Фракции элюата с колонки с сефадексом G-10 (мелкий) из опыта, описанного выше, содержащие одно пятно с  $R_f$  0,26 в системе А (бумага FN-2), объединяли, упаривали в вакууме досуха, промывали спиртово-эфирной смесью (1:1, 10 мл). Выход соединения (IV) 0,06 г (10,6%) в виде коричневатого-оранжевого порошка с чистотой 75%. Дальнейшую очистку проводили так, как описано для соединения (II).  $R_f$  0,26 (А), 0,56 (Б), 0,77 (В). ПМР в  $D_2O$  при  $pD$  7,7,  $\delta$ , м.д.: 7,66 с (1H, 6-H), 6,89 с (1H, 9-H), 1,90 с (3H, 7-CH<sub>3</sub>).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ghisla S., Mayhew S. G. (1973) J. Biol. Chem., 248, 6568-6570.
2. Ghisla S., Mayhew S. G. (1976) Eur. J. Biochem., 63, 373-390.
3. Глебова Г. Д., Кириллова Н. И., Березовский В. М. (1979) Ж. общ. химии, 49, 1884-1898.
4. Фетисова Т. П., Березовский В. М. (1977) Биоорг. химия, 3, 402-406.
5. Глебова Г. Д., Березовский В. М. (1977) Методы получения и анализа биохимических препаратов. Тезисы доклада научной конференции в г. Олайне, октябрь 1977, изд. НИИТЭХИМ, Черкасский филиал, с. 28.
6. Березовский В. М., Артемкина Р. В., Чернова М. А. (1965) Ж. общ. химии, 35, 677-681.
7. Watanabe T., Matsui K., Kasai S. (1978) J. Biochem., 84, 1441-1446.
8. Scola-Nagelschneider G., Hemmerich P. (1976) Eur. J. Biochem., 66, 567-577.

Поступила в редакцию  
4.V.1979

После доработки  
19.VII.1979

#### NUCLEOTIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS. XXXIII. SYNTHESIS AND TAUTOMERISM OF 8-HYDROXY(NOR)FLAVIN MONONUCLEOTIDE

GLEBOVA G. D., BEREZOVSKII V. M.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

Natural 8-hydroxy(nor)flavin mononucleotide has been synthesized for the first time by phosphorylating 8-hydroxy(nor)riboflavin. In aqueous solution 8-hydroxy(nor)-FMN exists in two tautomeric forms: benzoquinoid 8-oxo form at  $pH \geq 6.9$  and phenolic 8-hydroxy form at  $pH \leq 3.5$ . Both tautomeric forms were characterized by UV, visible, and fluorescence spectra, and  $pK_a$  and  $K_t$  values were determined. The phosphorylation reaction was found to be accompanied by the formation of 8-hydroxy(nor)riboflavin 4'-phosphate and 8-hydroxy(nor)riboflavin 5'-diphosphate.